

Alana Aalto-Setälä ja Reetta Savaloja

Ei-pienisoluisen keuhkosityövän kopiomäärämuutosten osoittaminen molekyyliryöpytyksellä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

16.4.2013

<p>Tekijät Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Alana Aalto-Setälä ja Reetta Savaloja Ei-pienisoluisen keuhkosityövän kopiomäärämuutosten osoittaminen molekyylidikaryotyyppityksellä 46 sivua + 5 liitettä 16.4.2013</p>
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Lehtori Hannele Pihlaja Professori Sakari Knuutila
<p>Keuhkosityöpä on maailmanlaajuisesti merkittävä syöpätauti, joka oli vuonna 2010 Suomessa miesten yleisin ja naisten toiseksi yleisin syöpäkuolinsyy. Keuhkosityöpä voidaan jakaa histologisesti kahteen luokkaan. Ei-pienisolainen syöpämuoto kattaa noin 75 % kaikista keuhkosityöpätapauksista.</p> <p>Tällä hetkellä niin sanottu 'personalised medicine' on terveydenhuollossa erityisen mielenkiinnon kohteena ja joitakin onkogeneenien signaalivälitykseen vaikuttavia täsmälääkkeitä on jo markkinoilla. Täsmälääkkeet eivät aina tehoa, joten karsinogeneesiin johtavien kohdegeenien tarkempi tutkiminen edistää merkittävästi syövän tutkimusta ja hoitoa.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston Haartman-Instituutin sytomolekyyli-genetiikan laboratoriossa Sakari Knuutilan tutkimusryhmässä keväällä 2013. Tavoitteena oli osoittaa tutkimukseen valituista keuhkosityöpä-näytteistä kopiomäärämuutoksia molekyylidikaryotyyppityksellä. Tarkoituksena oli määrittää array-CGH -menetelmällä yleisimmin toistuvat sekä pienimmät yhteiset kopiomäärämuutosalueet. Lisäksi tutkimukseen valittiin neljä tunnetua keuhkosityöpään liittyvää geeniä (ALK, BRAF, EGFR ja KRAS), joiden mutaatiostatuksia oli tarkoitus vertailla kopiomäärämuutosalueisiin.</p> <p>Kopiomäärämuutoksia tutkittiin yhteensä 28:sta näytteestä. Niitä löytyi 20 näytteestä yhteensä 166:lta erilliseltä alueelta, joista noin 72 % oli amplifikaatioita. Amplikoneja osoitettiin yksi komosomissa 17q12. Yleisimmät yhteiset amplifikaatioalueet olivat kromosomeissa 1q, 5p, 8q ja 14q ja deletioalueet kromosomeissa 6q ja 19p. Otoksen vaihtelevuuden vuoksi geenimutaation ja kopiomäärämuutoksen välillä ei voitu osoittaa olevan yhteyttä. Näytteiden esitetietojen vaihtelevuuden ja pienen otoskoon vuoksi riippuvuussuhteita tupakan käytön, geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten välillä ei voitu luotettavasti osoittaa.</p> <p>Näytteistä voitiin osoittaa yhteisiä, toistuvia kopiomäärämuutosalueita. Jatkotutkimuksia kuitenkin tarvitaan mahdollisten drivergeenien ja kohdegeenien tunnistamiseksi. Tutkimuksen tarkoituksena oli tunnistaa nämä alueet ja tämä onnistui odotetulla tarkkuudella. Tutkimuksessa käsiteltiin vain neljää keuhkosityöpään liittyvää geeniä, mutta sekvensoinnilla löydettyjä geenimutaatioita oli yhteensä 40, joita tulisi myös verrata osoitettuihin kopiomäärämuutoksiin.</p>	
Avainsanat	ei-pienisolainen keuhkosityöpä, geenikopiomäärä, aCGH, molekyylidikaryotyyppitys

Authors Title Number of Pages Date	Alana Aalto-Setälä and Reetta Savaloja Detection of Copy Number Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer with Virtual Karyotyping 46 pages + 5 appendices 16th April 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme Specialization Option	Biomedical Laboratory Science Biomedical Laboratory Science
Instructors	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Sakari Knuutila, Professor
<p>Lung cancer is the most common cause of cancer-related death worldwide. Lung cancer is divided into two, histology-based categories. Approximately 75% of cancer cases is non-small cell lung cancer (NSCLC).</p> <p>At the moment, personalised medicine is a new trend in medical treatment and targeted therapies are available. Gene expression, and thus, the growth of cancer cells may be inhibited by targeted therapies; this method can be used for copy number altered genes as well. However, for a successful targeted cancer treatment, a specific genetic mutation is required, so identifying new target genes is essential for diagnosis and prognosis purposes.</p> <p>This study was performed at the Laboratory of Cyto-molecular Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki, Finland, during spring 2013. The purpose of this study was to detect gene copy number alterations from the selected tissue samples by performing virtual karyotyping. The main goal was to detect the most recurring and minimal common regions of the genomic copy number alteration events using the array CGH technology. Additionally, four well known lung cancer related genes, ALK, BRAF, EGFR and KRAS, were chosen, so we could compare mutation status of these genes to the detected copy number alteration regions.</p> <p>Data for this study was collected from 28 samples. The total amount of the detected copy number alterations was 166 of the total of 20 samples. 72% of the detected alteration events were copy number gains. Only one amplification was detected in locus 17q12. The most commonly recurring gains were in loci 1q, 5p, 8q and 14q, and losses in loci 6q and 19p. Correlation between a mutated oncogene and a copy number alteration event could not be detected. Due to the inconsistent clinical status and small sampling, correlations between smoking status, oncogene mutation and copy number alteration could not be verified.</p> <p>The results lead to the conclusion that common, recurring copy number alterations could be identified. Therefore, this study provided the required data needed for further analysis. This study was narrowed down to four clinically relevant oncogenes, but there was a total number of 40 identified lung cancer related mutations which should also be compared with the copy number alteration data. Moreover, further analysis is needed to identify the target genes and possible driver genes for the copy number alterations.</p>	
Keywords	NSCLC, copy number alterations, array CGH, virtual karyotyping

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Syövän synty	2
2.1	Onkogeenit ja kasvurajoitegeenit	3
2.2	Kopiomäärämuutokset	4
3	Keuhkosityöpä	6
3.1	Altistavat tekijät	7
3.2	Perimän muutokset keuhkosityövässä	8
3.2.1	ALK	8
3.2.2	BRAF	9
3.2.3	EGFR	9
3.2.4	KRAS	9
3.3	Keuhkosityövän hoito	10
4	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	11
5	Molekyylikärytyypitys	13
5.1	Array-CGH:n periaate	14
5.2	Menetelmään vaikuttavat tekijät	17
6	Toteutus	18
6.1	Näytemateriaali	18
6.2	Työn suoritus	20
6.3	Tulosten analysointi	28
7	Tulokset	30
7.1	Kärytyypitys ja yhteiset kromosomialueet	31
7.2	Geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten vertailu	34
8	Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi	37
9	Pohdinta	39
	Lähteet	42

Liitteet

Liite 1. Laboratoriopäiväkirja

Liite 2. NanoDrop-mittaustulokset

Liite 3. Mikrosirujen pipetointikaaviot: näytesarjat ja hybridisaatioparit

Liite 4. Potilasnäytteiden karyotyypit

Liite 5. QC-raportit

1 Johdanto

Keuhkosyöpä on maailmanlaajuisesti merkittävä syöpätauti. Noin 90 % keuhkosyövistä aiheutuu tupakoinnista, muita altistavia tekijöitä ovat esimerkiksi työperäiset altisteet, passiivinen tupakointi ja perimä. Keuhkosyöpä voidaan jakaa histologisesti kahteen luokkaan, pienisolaiseen ja ei-pienisolaiseen keuhkosyöpään. Ei-pienisolainen syöpämuoto (tässä työssä NSCLC) kattaa noin 75 % kaikista keuhkosyöpätapauksista.

Tällä hetkellä niin sanottu 'personalized medicine' on terveydenhuollossa erityisen mielenkiinnon kohteena. Tiettyjen geenimutaatioiden yhteyttä keuhkosyövän syntyyn on tutkittu viime vuosina ja joitakin onkogeenien signaalivälitykseen vaikuttavia täsmälääkkeitä on jo markkinoilla ja uusia kehitellään jatkuvasti. Uudetkaan lääkkeet eivät tosin paranna keuhkosyöpää, vaan tuovat joitakin kuukausia lisää elinaikaa. Tilastollisesti tämä ei kuulosta merkittävältä, mutta oireeton lisääntynyt elin-aika on hyvin tärkeää sekä potilaille että heidän omaisilleen. Täsmälääkkeet eivät kuitenkaan tehoa kaikilla potilail-la, joten karsinogeneesiin johtavien kohdegeenien tarkempi tutkiminen edistää merkittävästi syövän tutkimusta ja hoitoa. Geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten on tutkimuksissa todettu korreloivan keskenään erityisesti EGFR-onkogeenin mutaatioiden yhteydessä. Kopiomäärämuutokset ovat syöpäkuksessa huomattavasti yleisempiä kuin normaalikuksessa, minkä vuoksi ne ovat oivallisia syövän biomarkkereita.

Opinnäytetyö suoritetaan Helsingin yliopiston Haartman-Instituutin sytomolekyylogeneetiikan laboratoriossa Sakari Knuutilan tutkimusryhmässä keväällä 2013 (tässä työssä CMG-laboratorio). Opinnäytetyö on osa CMG-laboratorion suurempaa tutkimuskokonaisuutta, jonka päämääränä on kartoittaa geenien kopiomäärämuutoksia ja niiden yhteyttä geenien pistemutaatioihin ja tällä tavoin löytää uusia, kliinisesti merkittäviä keuhkosyövän biomarkkereita. CMG-laboratoriossa on sekvensointimenetelmien avulla löydetty runsaasti uusia geenien pistemutaatioita ja tämänhetkisen tutkimuksen kohteena ovat näiden geenimutaatioiden mahdollinen yhteys keuhkosyöpään sekä geenien muutosalueilla mahdollisesti piilevät kopiomäärämuutokset. Opinnäytetyön näyttemateriaali on valittu näiden aiemmin sekvensoitujen näytteiden joukosta.

Opinnäytetyön tarkoituksena on osoittaa tutkimukseen valituista keuhkosyöpänäytteistä kopiomäärämuutoksia molekyylikaryotyypityksellä. Käytettäväksi menetelmäksi on valittu array-CGH, koska tarkoituksena on tarkastella kopiomäärämuutoksia koko geno-

min laajuisesti. Työn tavoitteet kopiomäärämuutosten analysoinnin osalta voidaan jakaa kahteen osaan. Ensinnäkin tavoitteena on määrittää yleisimmin toistuvat sekä pienimmät yhteiset kopiomäärämuutosalueet. Näiltä määritetyiltä alueilta tullaan jatkotutkimuksissa etsimään geenejä, joihin mahdollinen kopiomäärämuutos kohdistuu. Lisäksi tutkimukseen valittiin neljä tunnettua keuhkosyöpään liittyvää geeniä (ALK, BRAF, EGFR ja KRAS), joiden osalta on tarkoitus verrata, korreloivatko geenimutaatio ja kopiomäärämuutos keskenään.

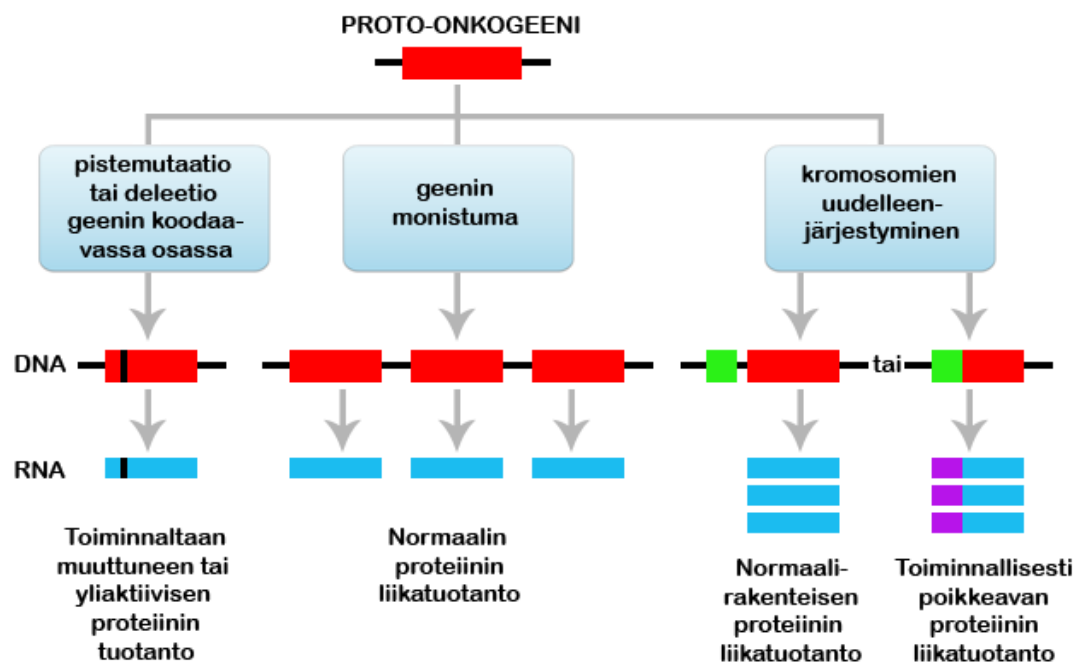
Opinnäytetyön alussa esitetään työn ymmärtämisen kannalta tärkeä teorian tieto. Aikaisemmissa, tutkimusryhmässä tehdyissä bioanalytiikan opinnäytetöissä on kattavasti ja yksityiskohtaisesti käyty läpi syövän syntyyn ja keuhkosyöpään liittyvää teorian tietoa, joten tässä työssä esitellään ainoastaan tutkimuksen aiheen kannalta olennaiset asiat. Näytemateriaali on ei-pienisoluisia keuhkosyöpäkudosta, joten luodaan katsaus tämän keuhkosyöpämuodon altistaviin tekijöihin, hoitoon ja perimän muutoksiin. Myös tutkimukseen valitut keuhkosyöpään liittyvät geenit esitellään. Teorian tietoa käytetystä tutkimusmenetelmästä painotetaan yksityiskohtaisella molekyylikaryotyypityksen ja array-CGH-tekniikan periaatteiden läpikäynnillä. Lopuksi esitetään työn tulokset ja niiden johtopäätökset, arvioidaan prosessin ja tulosten luotettavuutta sekä pohditaan työn onnistumista ja tulosten merkitystä.

2 Syövän synty

Syöpä on seurausta solun kasvua säätelevien tai DNA:ta korjaavien geenien mutaatioista. Syöpäkasvain on monoklonaalinen eli sen alkulähde on aina yksittäinen solu, joka mutaation seurauksena alkaa jakautua hallitsemattomasti ja jonka jälkeläissoluille kyseinen mutaatio periytyy. Mutaatioita tarvitaan solulinjassa useita, jotta solusta kehittyy kasvainsolu. (Isola 2007: 16–33.) Satunnaisesti kehittyneessä syövässä mutaatiot ovat somaattisissa soluissa, joten ne eivät ole periytyviä. Syöpäalttiusgeeni voi sijaita myös sukusoluissa (ei-somaattinen solu), jolloin se on perinnöllinen, mutta solun kehittyminen kasvainsoluksi saakka vaatii lisäksi somaattisia mutaatioita ja yleensä myös ympäristöstä tulevan ärsykkeen. (Aittomäki – Peltomäki 2006: 186–204.)

2.1 Onkogeenit ja kasvurajoitegeenit

Solun kasvua suoraan säätelevien geenien mutaatioilla on suuri merkitys syövän synnyssä. Proto-onkogeenit ovat normaaleja solun geenejä. Ne voivat tiettyjen muutosten kautta osallistua kasvainsolujen kehittymiseen ja syntyyn. Niiden tehtävänä ei kuitenkaan ole varsinaisesti tuottaa vain syöpäsoluja, vaan ne ovat tärkeitä toimijoita myös normaaleissa signaalinsiirtoketjuissa. Proto-onkogeenin muuttuminen onkogeeniksi (eli onkogeenin aktivoituminen) voi tapahtua tavoilla, jotka on esitetty kuviossa 1. (Lehto – Stenbäck 2012a: 251–254.) Onkogeenien normaali tehtävä on solun kasvun edistäminen, joten jo yhden alleelin mutaatio voi riittää aiheuttamaan solunkasvun kiihtymisen. (Isola 2007: 16–33; Lehto – Stenbäck 2012b: 250–251.)



Kuvio 1. Onkogeenien aktivoitumisreitit (Lehto – Stenbäck 2012a: 251–254).

Erilaiset mutaatiot proto-onkogeeneissa, esimerkiksi pistemutaatiot tai deleetiot, voivat aiheuttaa solussa toiminnaltaan muuttuneen proteiinin tuotannon, kun taas geenin monistumassa normaalia proteiinia tuotetaan liikaa. Kromosomien uudelleenjärjestymisissä geeni voi joutua voimakkaan tai normaalista poikkeavan säätelyalueen vaikutuksen alaiseksi, mikä voi johtaa normaalirakenteisen proteiinin liikatuotantoon. Jos uudelleenjärjestymässä syntyy kahden eri geenin muodostama fuusiogeeni, voidaan sen koodaama fuusioproteiini tuottaa aktiivisen fuusiopartnerin tuotannon vuoksi liikaa. (Lehto – Stenbäck 2012a: 251–254.)

Toinen syövän kehittymiselle tärkeä geeniryhmä on kasvurajoitegeenit, jotka normaalisti toimiessaan hidastavat solun jakautumista tai estävät sen kokonaan. Kun onkogeenin aktivoituminen aiheuttaa syöpäsolun jakaantumisen, kasvunrajoitegeeneillä vaikutus on päinvastainen: solu aloittaa hallitsemattoman jakautumisen geenien toiminnan heikentyessä. Kasvurajoitegeenit tarvitsevat yleensä molempien alleelien vaurion, mutta nykyisin tunnetaan myös joukko kasvurajoitegeenejä, jotka edistävät syövän kasvua yhdenkin alleelin vaurion myötä. Tyypillistä syöpäsoluille on myös kehittynyt kyky levitä ympäröivään kudokseen sekä etäpesäkkeiden muodostaminen, mikä on seurausta solujen kiinnittymistä säätelevien proteiinien heikentymisestä. (Isola 2007: 16–33; Lehto – Stenbäck 2012b: 250–251.)

2.2 Kopiomäärämuutokset

Kopiomäärämuutos on perimän mutaatio, jossa DNA-jakson kopioiden määrä poikkeaa normaalista. Normaali kromosomisto on diploidi, joten normaali geenikopiomäärä autosomeissa ja homogameettisissa sukupuolikromosomeissa (kromosomit XX) on kaksi; heterogameettisissa sukupuolikromosomeissa (kromosomit XY) kopiomäärä on yksi. Muutosalue voi kattaa joko koko geenin tai vain osan geenistä, mutta se voi myös olla koko kromosomiston laajuinen. (Genetics Home Reference 2013.) Kopiomäärän ollessa normaalia alhaisempi puhutaan häviämästä eli deletiosta, jossa joko toinen (heterotsygootinen deletio) tai molemmat (homotsygootinen deletio) alleelit ovat hävinneet. Kopiomäärän ollessa normaalia suurempi puhutaan monistumasta eli amplifikaatiosta. Monistuman ollessa huomattavan suuri (yli viisinkertainen) ja kapealle alueelle keskittynyt (korkeintaan 20 megaemäksen kokoinen), sitä kutsutaan korkean asteen monistumaksi eli amplikoniksi. Amplikon voi sisältää satoja geenin kopioita. (Myllykangas – Böhling – Knuutila 2007.)

Tässä opinnäytetyössä käytetään kopiomäärän häviämästä termiä deletio ja monistumasta termiä amplifikaatio. Korkean asteen monistumasta käytetään termiä amplikon. Englanninkielisessä kirjallisuudessa deletiosta voidaan käyttää myös termiä 'loss', monistumasta termiä 'gain' ja korkean asteen monistumasta termiä 'amplification'. Nämä termit esiintyvät tulostulosten kuvioissa luvussa 7. Kuviossa 2 on esitetty kopiomäärämuutokset emästasolla.

normaali: . . .CTA**TAC**GTAGG . . .

deleetio: . . .CTA GTAGG . . .

amplifikaatio: . . .CTA**TACTAC**GTAGG . . .

amplikon: . . .CTA**TACTACTACTACTACTACTAC**GTAGG . . .

Kuvio 2. Esimerkkejä kopiomäärämuutoksista emästasolla.

Kromosomitason mutaatiot ovat myös havaittavissa kopiomäärän muutoksena silloin kun mutaation seurauksena geneettisen materiaalin määrä on vähentynyt tai lisääntynyt. Tyypillinen tällainen tilanne on isokromosomi tai epätasapainoinen translokaatio, jossa uudelleenjärjestyvät kromosomin osat ovat eri mittaiset. Disentristen (kahden sentromeerin kromosomien) tai rengaskromosomien yhteydessä tapahtuu usein kopiomäärän häviämää. (Genetics Home Reference 2013.)

Kopiomäärämuutosten on tutkimuksissa todettu liittyvän keuhkosityövän syntyyn, mutta hyvin pieni osa löydetyistä muutosalueista on pystytty yhdistämään johonkin tunnettuun keuhkosityöpägeeniin. Vuonna 2012 tehdyssä tutkimuksessa tupakoimattomilla adenokarsinoomapotilailla (n = 69) esiintyi eniten amplifikaatioita kromosomeissa 5q, 7p ja 16p. Yleisimmät deleetiokohdat olivat kromosomeissa 10q ja 15q. (Thu ym. 2012.) Vuonna 2010 tehtiin toinen tutkimus saman kokoluokan otoksella (n = 60) tupakoimattomista adenokarsinoomapotilaista. Yleisimmät amplifikaatiokohdat olivat tutkimuksen mukaan kromosomeissa 1q, 5p, 7p, 8q ja 16p, vastaavasti yleisimmät deleetiokohdat olivat 8p, 9p, 9q, 13q ja 18q (muutoksia yli 20 %:ssa näytteistä). (Job ym. 2010.) Vuonna 2007 tehtiin tähän mennessä laajin adenokarsinooman geenikopiomääriin liittyvä tutkimus (n = 371). Tutkimuksen perusteella tupakoimattomilla adenokarsinoomapotilailla esiintyi eniten amplifikaatioita kromosomissa 5p (60 %:ssa näytteistä) ja yleisin amplikon-alue oli kromosomissa 14q13.3 (noin 12 %:lla). (Weir ym. 2007: 893–898.)

Geenin kopiomäärän amplifikaatio voi aiheuttaa onkogeenin aktivoitumisen ja vastaa- vasti deleetio voi johtaa kasvunrajoitegeenin inaktivoitumiseen. Molemmissa tapauk- sissa muutos voi laukaista solun muuttumisen kasvainsoluksi. Amplikonissa geenialue on monistunut moninkertaisesti, joten myös onkogeenin yliekspressio on tällöin suu- rempaa. Amplikonit ovat tyypillisiä muutoksia kiinteissä syöpäkasvaimissa. Vuonna

2007 tehdyn tutkimuksen mukaan amplikonien yleisyys NSCLC:ssä on noin 65 % (n = 450, joissa yhteensä 294 amplikonia). (Myllykangas ym. 2007.) Kopiomäärän muutos voi vaikuttaa myös epigeneettisiin säätelymekanismeihin ja aiheuttaa geenin inaktivoitumisen. Tällaisia mekanismeja ovat metylaatio ja histonien deasetylaatio, jotka säätelevät DNA:n transkriptiota ja geeniekspressiota. (Weir – Meyerson – Zhao 2004: 433–438.)

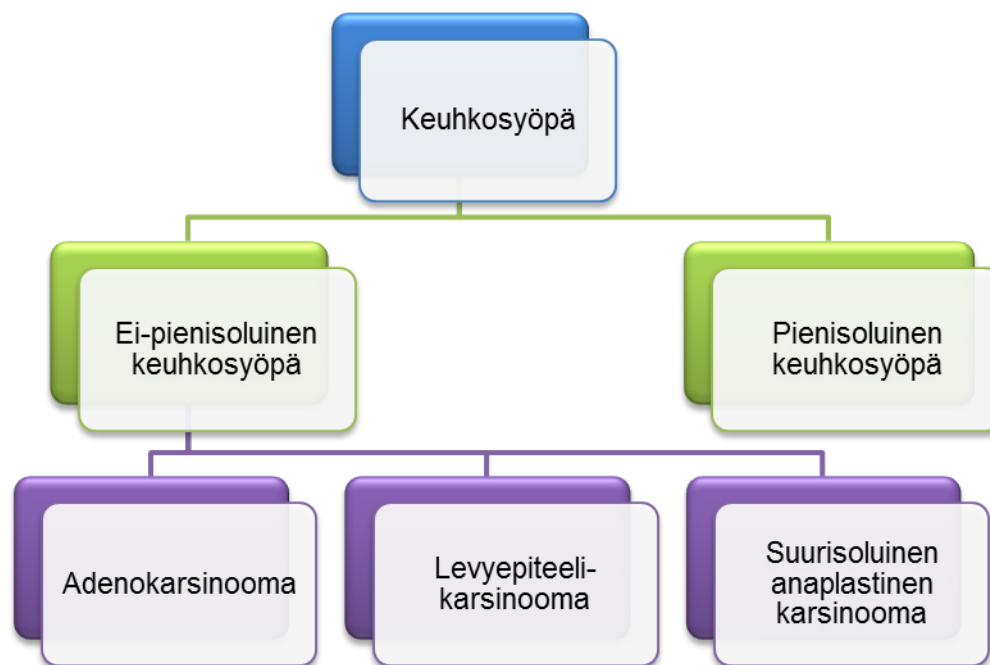
Kopiomäärän muutoksen vaikutus riippuu muutoksen laajuudesta ja sen vaikutuksesta geenituotteena syntyvään proteiiniin. Kopiomäärän muutoksen osuessa geenin eksoniin voi aiheutua aminohapon lukukehyyksen muuttuminen, minkä seurauksena syntyvä aminohappo muuttuu toiseksi (missense) tai aminohappojen luku keskeytyy (nonsense). Näin syntyneellä geenin toiminnan muutoksella voi olla ratkaiseva vaikutus syöpäsolun syntyyn, jos solun jakautumiseen tai DNA-vaurioiden korjausmekanismiin osallisena olevan proteiinin toiminta muuttuu. (Heino – Vuento 2009: 317–330.)

Genomin kopiomäärämuutoksista noin 2–15 % arvioidaan kuuluvan normaaliin perimän vaihteluun, tästä käytetään termiä CNV (copy number variation). CNV on verrattavissa yhden nukleotidin pistemutaation polymorfismiin (SNP), mutta muutosalueet voi olla laajuudeltaan useita megaemäspareja (Mb). CNV:t ovat tyypillisesti periytyviä, kun taas syöpään liittyvät kopiomäärämuutokset ovat luonteeltaan somaattisia (Zhang 2010: 259–281.) Normaali genomin variaatio voidaan erottaa muista kopiomäärämuutoksista genomitietokantojen avulla. Kopiomäärämuutokset ovat syöpäkudoksessa huomattavasti yleisempiä kuin normaalikudoksessa, minkä vuoksi ne ovat oivallisia biomarkkereita. Biomarkerit ovat molekyyliä, jotka kuvaavat normaaleita biologisia prosesseja tai esimerkiksi syöpätautien tilaa. (Myllykangas ym. 2007.)

3 Keuhkosityöpä

Keuhkosityöpä on maailmanlaajuisesti merkittävä syöpätauti. Suomessa se oli vuonna 2010 miesten yleisin syöpäkuolemasyy ja naisilla toiseksi yleisin. (Suomen Syöpärekisteri 2012a; Suomen Syöpärekisteri 2012b.) Vaikka ennuste on vuosien saatossa parantunut, kaikista potilaista on elossa viisi vuotta syövän toteamisen jälkeen vain 5–13 % sukupuolesta, iästä ja syövän laadusta riippuen. Keuhkojen epitelialiset syövät voi histologisesti jakaa kahteen pääryhmään: pienisoluisen

keuhkosityöpään (small cell lung cancer, SCLC) ja ei-pienisoluiseen keuhkosityöpään (non-small cell lung cancer, NSCLC) (Kuvio 3). (Käypä Hoito 2008; Mali – Ojala – Salo 2006: 277–279.)



Kuvio 3. Keuhkosityövän histologinen luokittelu (Mali – Ojala – Salo 2006: 279).

Ei-pienisoluinen syöpämuoto kattaa noin 75 % kaikista keuhkosityövistä. Noin 40–50 % keuhkosityövistä on adenokarsinoomia ja niiden osuus on edelleen kasvussa. (Käypä Hoito 2008.) Opinnäytetyömme aineisto koostuu eri NSCLC:n alalajeista.

3.1 Altistavat tekijät

Tärkein keuhkosityövälle altistava tekijä on tupakointi, joka aiheuttaa noin 90 % keuhkosityövistä. Tupakoinnin lopettaminen pienentää syöpäriskiä, mutta riski ei kuitenkaan koskaan saavuta tupakoimattomien tasoa. Passiivinen tupakointi suurentaa sairastumisen vaaraa 2–3 kertaiseksi. (Mali ym. 2006: 277–278.) Toinen keskeinen syöpäriskin kasvattaja ovat erilaiset työperäiset altisteet kuten esimerkiksi asbesti. Nykyään asbestin käyttö on Suomessa kiellettyä, mutta sitä löytyy vielä vanhoista rakennuksista, joissa sille altistuvat purkutöiden tekijät suojausmääräysten puutteellisen noudattamisen vuoksi. Yhdessä tupakka ja asbesti lisäävät voimakkaasti

toistensa aiheuttamaa riskiä. (Huuskonen – Jahkola – Oksa 2010; Knuuttila 2011; Käypä Hoito 2008; Mali ym. 2006: 277–278.)

3.2 Perimän muutokset keuhkosityövässä

Vaikka tupakoinnilla on suuri merkitys keuhkosityövän synnyssä, eivät kaikki keuhkosityöpäpotilaat tupakoi. Tupakansavulle altistumisen lisäksi myös perimällä on väliä. Vaikka keuhkosityöpä ei ole missään muodossaan perinnöllinen sairaus, voi alttius keuhkosityöville periytyä geenimutaatioiden muodossa ja erilaisia mutaatioita onkin tutkittu ahkerasti viime vuosien aikana. (Knuuttila 2011; Mali ym. 2006: 277–278.) Opinnäytetyöhömmme valittiin tutkittaviksi neljä geeniä: ALK, BRAF, EGFR ja KRAS. Tässä kappaleessa on esitelty lyhyesti nämä geenit ja niiden ilmentyminen NSCLC:ssä. Taulukossa 1 on tarkempaa tietoa geenien ominaisuuksista.

Taulukko 1. Geenimuutokset keuhkosityövässä. Geenien paikkatiedot otettu OMIM-tietokannasta. (OMIM 2013; Koivunen ym. 2008; Brose ym. 2002: 6997–7000; Pao ym. 2004; Riely ym. 2008: 5731–5734.)

Geeni	Muutos	Sijainti	Yleisyys NSCLC:ssä
ALK	Uudelleenjärjestymä	2p23.2p23.1	3–7 %
BRAF	Mutaatio	7q34	1–3 %
EGFR	Mutaatio	7p11.2	10–35 %
KRAS	Mutaatio	12p12.1	15–25 %

3.2.1 ALK

Anaplastista lymfoomakinaasia koodaavan ALK-geenin uudelleenjärjestymiä on kuvattu useissa syövässä. Yleisin fuusioituma on esimerkiksi Non-Hodgkinin lymfoomassakin esiintyvä NPM-ALK, joka kattaa noin 80 % translokaatioista. (Amin – Lai 2007: 2259 – 2267.) NSCLC:hen liittyviä fuusiopareja on tunnistettu useita, joista tämänhetkisen mielenkiinnon kohteena on erityisesti EML4-ALK -fuusiogeneeni. Tämän fuusion on tutkimuksissa osoitettu olevan hyvin tärkeässä asemassa kasvainten synnyssä. Lisäksi sen on huomattu olevan hyvin vastustuskykyinen EGFR-tyrosiinikinaasi-inhibiittorihoidoille. ALK-fuusiot ovat tyypillisiä muutoksia vähän tupakoineille (alle 10 askivuotta) ja ei-

tupakoiville, aasialaisille, sekä nuoremmille keuhkosyöpäpotilaille. (Shaw ym. 2009; Koivunen ym. 2008.)

3.2.2 BRAF

BRAF kuuluu seriini-treoniini-proteiinikinaasia koodaavaan geeniperheeseen. RAF-1-geenit ovat keskeisiä tekijöitä MAP-kinaasin signaalikaskadissa ja osallistuvat näin solun lisääntymisen, erilaistumisen, transkription ja selviämisen säätelyyn. Tutkimuksissa esitetyn tiedon mukaan BRAF-mutaatioita on havaittu 66 %:ssa melanoomista, mutta myös pienessä osassa keuhkosyövistä. (Lovly – Horn – Pao 2012b; Brose ym. 2002.) Amerikkalainen tutkimusryhmä profiloï vuonna 2011 697 adenokarsinoomaa sairastavaa potilasta, tästä otoksesta pystyttiin osoittamaan BRAF-mutaatioita 18 potilaalla. Yleisimmät mutaatiokohdat olivat domeeneissa V600E, G469A ja D594G. Tyyppillisesti BRAF-muutoksia löytyy tupakoivilta ja tupakoinnin lopettaneilta adenokarsinoomapotilailta. (Paik ym. 2011: 2046–2051.)

3.2.3 EGFR

Eräs tunnetuimpia keuhkosyöpään liitetyistä geneettisistä muutoksista on epidermaalista kasvutekijäreseptoria koodaavan EGFR-geenin mutaatio ja siitä johtuva geenin yliekspressio. (Inoue – Nukiwa 2005.) EGFR kuuluu solukalvon tyrosiinikinaasireseptoreihin ja sen aktivoimat solunsisäiset signaalireitit vaikuttavat esimerkiksi solun lisääntymiseen. Yleisimmät EGFR-mutaatiot (suunnilleen 90 % kaikista geenin mutaatioista) ovat eksonin 19 deleetio ja eksonin 21 L858R-pistemutaatio. Adenokarsinoomassa EGFR-mutaatioita löydetään yleensä eïtupakoivilla naispotilailla. (Ladanyi – Pao 2008: 16–22.) Geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten on tutkimuksissa todettu korreloivan keskenään erityisesti EGFR-mutaation yhteydessä (Thomas – Weir – Meyerson 2006: 4384–4391).

3.2.4 KRAS

Ihmiseltä on tunnistettu kolme erilaista RAS-geeniä, joiden koodaamat proteiinit ovat keskeisiä osia solun lisääntymisen, selviytymisen ja erilaistumisen kannalta. Aktivoivat mutaatiot RAS-geeneissä aiheuttavat RAS-GTPaasin aktivaation myös kasvutekijäsignaalien puuttuessa, tällöin syntyy jatkuva signaali joka edistää solun lisääntymistä.

KRAS-mutaatiot esiintyvät yleensä kasvaimissa yhdessä villityypin drivergeenien, kuten EGFR:n ja ALK:n, kanssa. (Lovly – Horn – Pao 2012a; Lovly – Horn – Pao 2012c.) KRAS-mutaatiot ovat tyypillisesti yhden emäksen vaihdoksia, kuten esimerkiksi pistemutaatiot kodoneissa 12 ja 13. KRAS-onkogeeneit esiintyvät usein NSCLC:ssä varsinkin tupakoineilla potilailla ja näillä kasvaimilla on tapana olla aggressiivisesti leviäviä ja vastustuskykyisiä kemoterapialle: muutosten on kliinisissä tutkimuksissa osoitettu olevan tärkeitä negatiivisia biomarkkereita kun lähdetään arvioimaan syövän ennustetta. (Kalari ym. 2012; Riely – Ladanyi 2008.)

3.3 Keuhkosityövän hoito

Opinnäytetyön aiheen vuoksi tässä osiossa keskitytään nimenomaan NSCLC:n hoitoon. Keuhkosityövän hoidon valintaan vaikuttavat syövän histologinen luokitus, potilaan yleiskunto, leikkauskelpoisuus ja taudin kliininen levinneisyysaste. Syövän levinneisyysaste ja sen myötä ennuste ja hoitovaihtoehdot kuvataan TNM-luokituksella eli tumor-node-metastasis-luokituksella. TNM:stä käy ilmi kasvaimen koko ja levinneisyys, sekä metastaasi- ja imusolmukestatus. (Käypä Hoito 2008.)

Varhaisvaiheen NSCLC:ssä ensisijaisena hoitomuotona on leikkaus, jossa poistetaan joko keuhkolohko tai koko keuhko. Jos leikkaushoito ei ole mahdollista, voidaan potilaalle antaa joko primaarikasvaimen tai laajemmalle alueelle kohdistettu sädehoito riippuen syövän TNM-luokituksesta. Paikallisesti edenneet syövät voidaan hoitaa yhdistelmähoidoilla, joissa yhdistetään leikkaushoitoa solunsalpaajiin ja sädehoitoon. Solunsalpaajahoidojen siedettävyyden on kuitenkin leikkauksen jälkeen huomattavasti huonontunut, joten yhdistelmähoitoin valittavien potilaiden tulisi olla mahdollisimman hyväkuntoisia. Jos tauti on laajalle levinnyt, hoitona suositellaan palliatiivista solunsalpaajahoidoa tai muuta oireen mukaista hoitoa potilaan yleiskunnosta ja toimintakyvystä riippuen. (Knuuttila 2011; Käypä Hoito 2008; Mali ym. 2006: 288–289.)

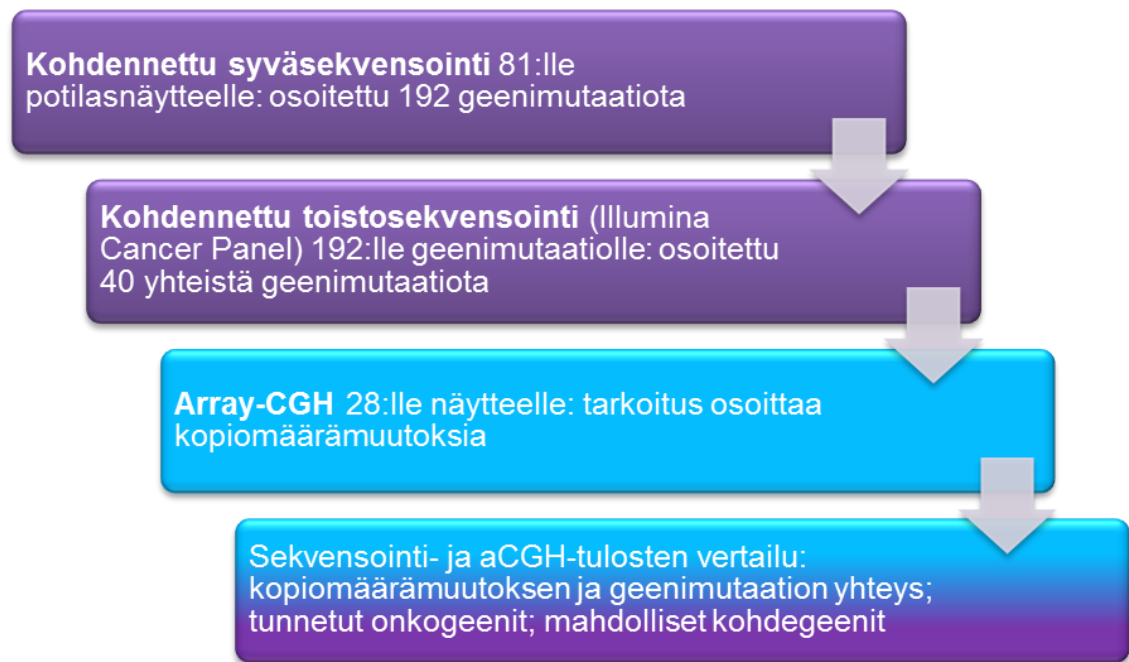
‘Personalised medicine’ tarkoittaa hoitoa, jossa otetaan huomioon potilaan henkilökohtaiset ominaisuudet, esimerkiksi perimän emäsjärjestyksen muutokset, mahdolliset geenien mutaatiot ja ilmentäminen. Näin pystytään tarjoamaan tehokkaampaa hoitoa potilaalle soveltuvilla menetelmillä oikeaan aikaan. Myös NSCLC:ssä on tutkittu onkogeeneiden signaalivälitykseen suoraan vaikuttavia lääkeaineita. Tutkimukseemme liittyvistä geeneistä vain ALK:lle ja EGFR:lle on kehitelty kohdennettuja hoitoja. (Mali ym. 2006: 291; Kallioniemi – Pitkänen – Knowles

2010; National Cancer Institute 2012.) Suoraan KRAS-välitteistä karsinogeneesiä inhiboivia hoitoja ei ole vielä pystytty luomaan. BRAF-entsyymi-inhibiittorihoitoja on tutkittu varsinkin melanooman yhteydessä, joten keuhkosyöpään soveltuvia hoitoja voidaan olettaa jossain vaiheessa saatavan. (Kalari ym. 2012; Ribas – Flaherty 2011.) NSCLC:n hoitoon käytettyjen täsmälääkkeiden on havaittu toimivan paremmin tupakoimattomilla henkilöillä, joskin syytä tähän ei vielä tunneta. (Käypä hoito -suosituksen päivitystiivistelmä 2009.)

Vaikka kohdennetulla hoidolla on mahdollista saada lisäelinaikaa ja jopa oireettomia kuukausia, se ei paranna kokonaan syöpää. Jos hoito tehoaa, syöpä kuitenkin yleensä uusii jonkin ajan kuluttua. (Knuutila 2012a.) Hoitokeinojen monipuolisuudesta huolimatta kuratiivisten syöpähoitojen jälkeen tauti uusiutuu noin 50 %:lla kahden vuoden aikana ja 90 %:lla viiden vuoden aikana. Noin 70 % uusiutumista on laajalle levinneitä metastaaseja, joiden parantaminen ei ole mahdollista. Keuhkosyöpää kokonaan parantavaa hoitoa ei ole. (Mali ym. 2006: 293.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Keuhkosyöpää aiheuttavia geenimutaatioita on tutkittu paljon ja niiden tunnistamiseen on jo käytössä diagnostisia menetelmiä, mutta kaikkiin potilaisiin täsmähoidot eivät tehoa. CMG-laboratoriossa on jo vuonna 2011 käynnistetty tutkimus, jonka yhtenä kohteena ovat syöpäkasvainten syntyyn mahdollisesti vaikuttavat geenien kopiomäärämuutokset. Jos nämä kopiomäärämuutokset voidaan luotettavasti osoittaa ja varmentaa, voidaan tällä tavoin löytää uusia, kliinisesti merkittäviä syövän biomarkkereita. Löydettyjä biomarkkereita voidaan soveltaa kohdennettuun diagnostiikkaan ja yksilöityjen hoitojen kehittämiseen. Lisäksi tutkimusryhmän mielenkiinnon kohteena on saada lisää tutkimusta edistävää tietoa koko genomin alueelta. (Heino – Vuento 2009: 317–330; Knuutila – Wirtanen 2012.) Opinnäytetyömme on osa tätä tutkimuskokonaisuutta. Tässä kappaleessa esittelemme osuutemme tähän projektiin liittyen. Kuvio 4 kuvaa tutkimuksen kulun kokonaisuudessaan ja aineiston rajautumisen tutkimuksen edetessä.



Kuvio 4. CMG-laboratorion NSCLC-näytteiden tutkimusprosessi kokonaisuudessaan. Kopiomäärämuutosten osoittaminen on osa kokonaisuutta, siniset kohdat kuuluvat opinnäytetyömme osuuteen. (Knuutila 2013.)

Opinnäytetyömme tarkoituksena on osoittaa tutkimukseen valituista keuhkosyöpänäytteistä kopiomäärämuutoksia molekyylikaryotyyppityksellä. Menetelmänä toimii array-CGH, koska tarkoituksena on tarkastella kopiomäärämuutoksia koko genomin laajuisesti. Tavoitteenamme on määrittää yleisimmin toistuvat sekä pienimmät yhteiset kopiomäärämuutosalueet, joista tullaan jatkotutkimuksissa etsimään mahdollisia kopiomäärämuutoksiin liittyviä geenejä. Työhön valittiin myös neljä tunnettua keuhkosyöpään liittyvää geeniä (ALK, BRAF, EGFR ja KRAS), joiden osalta on tarkoitus verrata korreloivatko geenimutaatio ja kopiomäärämuutos keskenään.

Tutkimuksen aineistona on 28 potilasnäytettä, joiden DNA on eristetty formaliinifikoituista, parafiiniin valetuista (myöhemmin FFPE) tuumorikudosblokeista. Näytteet on valittu sekvensoitujen kudoksenäytteiden joukosta, joista on osoitettu pistemutaatioita syöpään liittyvissä geeneissä. Kohdennettu syvä- ja toistosekvensointi ovat Next Generation Sequencing -tekniikoita (NGS), joiden tarkoituksena on tuottaa erittäin suuri määrä sekvenssidataa samanaikaisesti kohdistetusti rajatulta genomialueelta. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 188–192.) Saatuja tuloksia verrataan normaaliin ihmisen genomiin ja sen perusteella tehdään tulkinta ovatko löytyneet kopiomäärämuutokset keuhkosyövän kannalta merkittäviä, sekä määritetään jatkotutkimusten kannalta tärkeimmät, toistuvimmat kromosomialueet.

Tutkimusta ohjaavat seuraavat kysymykset:

1. Onko aCGH-menetelmällä osoitettavissa geenien kopiomäärämuutoksia ei-pienisoluisista keuhkosityöpäkusnätteistä?
2. Mitkä ovat aCGH-menetelmällä osoitettujen kopiomäärämuutosten toistuvimmat ja pienimmät yhteiset alueet?
3. Vastaavatko aCGH-menetelmällä osoitetut kopiomäärämuutosalueet tutkimukseen valittuja sekvensoinnilla osoitettuja geenimutaatioita (ALK, BRAF, EGFR ja KRAS)?

Henkilökohtaisena tavoitteenamme on lisäksi aCGH-prosessin tuntemisen ja hallitsemisen kokonaisuudessaan sekä teoriassa että käytännössä. Tärkeänä tavoitteena on myös englanninkielisen ammattisanavaraston laajentaminen, kielitaidon kehittäminen sekä tutkimusryhmän toiminnan ja työtapojen ymmärtäminen.

5 Molekyylikaryotyyppitys

Molekyylikaryotyyppitys on syto- ja molekyyliogenetiikkaa yhdistävä menetelmä, jolla voidaan tutkia koko genomn jokaisen geenin kopiomäärämuutoksia mikrosirutekniikalla (Tyybäkinaja – Knuutila 2006). Molekyylikaryotyyppityksen on mahdollistanut genetiikan menetelmien kehittyminen ja sekvenssivertailun vuonna 2003 valmistunut koko ihmisen genomn sekvensointiprojekti, Human Genome Project (HUGO). Molekyylikaryotyyppityksen tuloksia voidaan verrata HUGO-projektin tuloksista rakennettuun ihmisen genomn tietokantaan ja siten saada selville tutkimuksen kohteena olevan näytteen geenikopiomäärien merkittävät deletiot ja amplifikaatioita. (Human Genome Organisation 2013; Tyybäkinaja – Knuutila 2006.)

Molekyylikaryotyyppityksellä on mahdollista määrittää muutosalueiden karyotyyppiraidoituksen tarkkuudella. Translokaatioiden katkoskohdat ovat myös määritettävissä, mikäli geenin kopiomäärä on muuttunut epätasapainoisen translokaation myötä. Näin karyotyyppitystä on voitu käyttää uusien syöpägeenien paikallistamiseen sekä syövän inhibiitorigeenien seulontaan. (Tyybäkinaja – Knuutila 2006.) Mikrosirutekniikan etuna on,

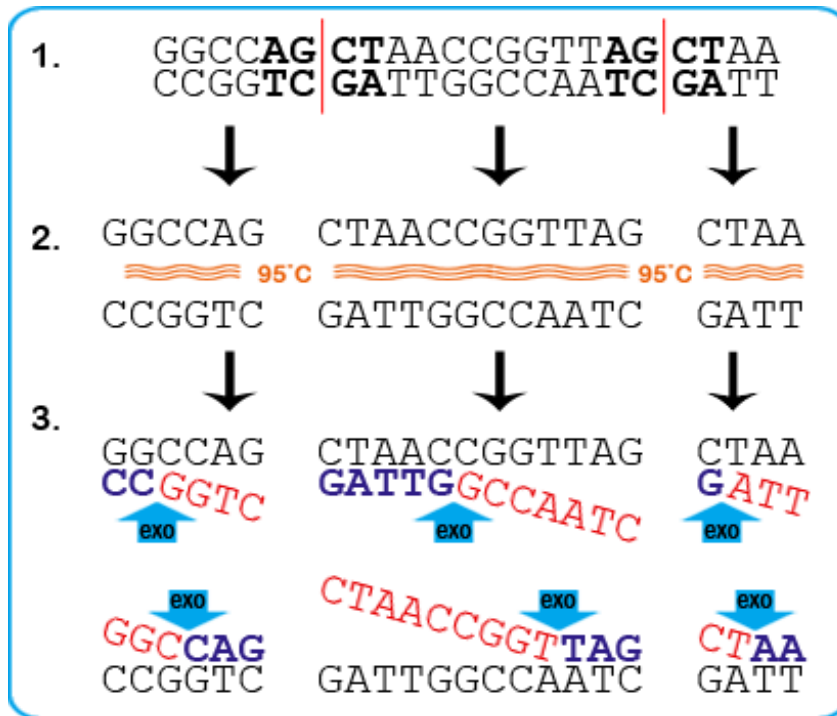
että yhdellä mikrosirulla saadaan tutkittua yhtäaikaaisesti tuhansia kudoksen geenejä (Knuutila 2000).

Toteutimme tutkimuksessamme molekyylikaryotyypityksen array-CGH -menetelmällä, josta käytämme opinnäytetyössämme kansainvälisesti tunnettua lyhennettä aCGH. Muita kirjallisuudessa menetelmästä yleisesti käytettyjä lyhenteitä ovat muun muassa VGH ja array-CGH, lisäksi voidaan myös puhua mikrosiru- ja mikrolevyteknikoista. Array-CGH tarkoittaa kirjaimellisesti mikrolevyalustalla tehtävää vertailevaa genomista hybridisaatiota (array comparative genomic hybridization) (Suominen ym. 2010: 206–210).

5.1 Array-CGH:n periaate

Array-CGH perustuu nukleiinihappojen hybridisaatioreaktioon, jossa kaksi toisilleen komplementaarista yksijuosteista nukleiinihappoketjua liittyy toisiinsa siten, että emäkset muodostavat vetysidoksen vastinemästensä kanssa, jolloin emäkset A–T ja G–C pariutuvat keskenään. Käytössämme oleva array-CGH-menetelmä on Agilentin suunnittelema, joten vaiheiden toimintaperiaatteet on esitetty Agilentin tietoihin perustuen. Muiden valmistajien aCGH-laitteet ja reagenssit saattavat olla joiltakin osin erilaisia. (Suominen ym. 2010: 206–210.)

Array-CGH:lla analysoitavan DNA:n tulee olla kontaminoivista proteiineista vapaata ja fragmentoitumatonta. Jotta kilpaileva sitoutuminen toimisi luotettavasti, tulee vertailtavan DNA:n konsentraation olla suhteessa sama. Tarvittaessa DNA:ta voidaan laimentaa. (Agilent Technologies 2012.) Digestiovaiheessa DNA pilkotaan (digestoidaan) pienempiin jaksoihin restriktioentsyymien avulla hybridisaatiovaiheen mikrosirun oligokoetimiin sitoutumisen helpottamiseksi. Restriktioentsyymi katkaisee DNA-juosteen tietystä kohdasta tunnistamansa nukleotidisekvenssin perusteella. (Suominen ym. 2010: 112–121.) Kuviossa 5 on selvennetty digestiovaiheen tapahtumat emästasolla. Restriktioentsyymi katkaisee DNA-juosteen tunnistamansa katkaisukohdan mukaisesti, jonka jälkeen katkaistut DNA-juosteet denaturoidaan korkeassa lämpötilassa (kuvion 5 kohdat 1 ja 2). Random primerit kiinnittyvät denaturoituun juosteeseen emäsjärjestyksensä mukaiseen kohtaan. Exo(-) Klenow -polymeraasi liittää fluoresenssileimattuja dNTP-nukleotideja juosteeseen alkaen random primerien kiinnityskohdasta (kuvion 5 kohta 3). (Agilent Technologies 2012; Suominen ym. 2010.)

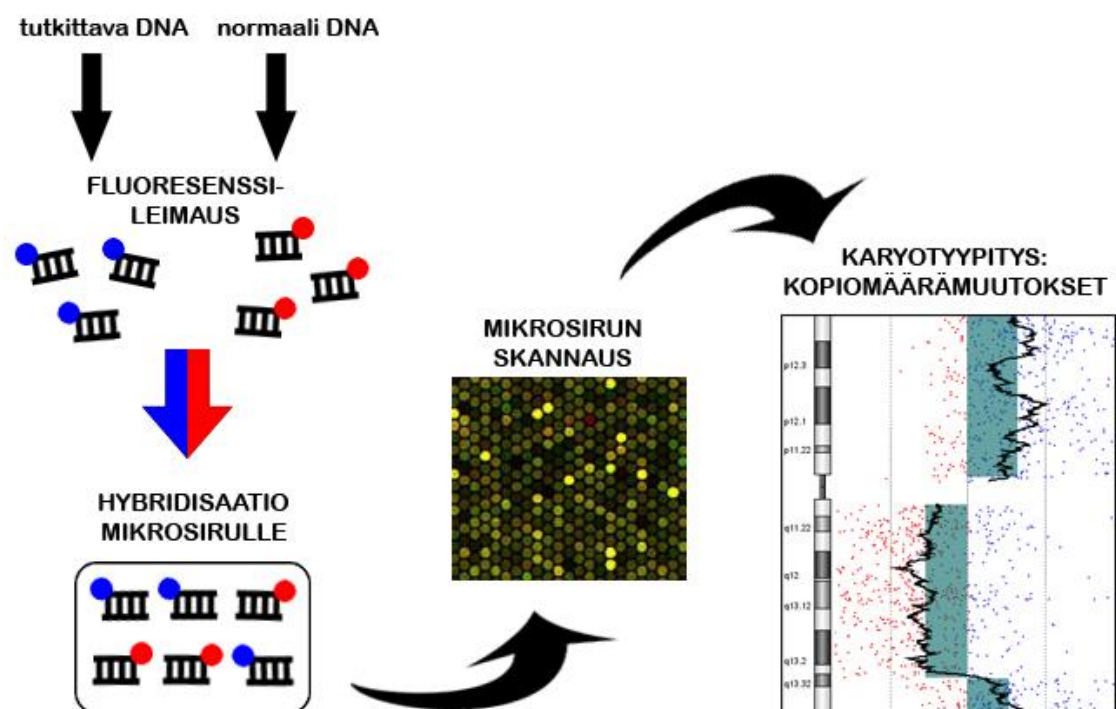


Kuvio 5. Digestiovaiheen tapahtumat emästasolla (Agilent Technologies 2012; Suominen ym. 2010).

Digestoimalla pilkottu DNA on leimattava fluorokromeilla, jotta se voidaan detektoida skannausvaiheessa (Agilent Technologies 2012). Tarkoituksena on, että mahdollisimman suuri osa geneettisestä materiaalista leimautuu, joten ensin pilkottu DNA denatroidaan 95 °C:ssa ja avattuun juosteeseen liitetään random primer -alukkeet, jotka sitoutuvat nimensä mukaisesti sattumanvaraisiin kohtiin. Eksonukleaasivapaa Klenow-fragmentti toimii 37 °C:n lämpötilassa ja jatkaa nukleotidien liittämistä syntetisoitavaan juosteeseen alkaen random primerien kiinnityskohdasta. Lopputuloksena on DNA-juoste, jossa alkuperäiseen juosteeseen ovat kiinnittyneet fluoresenssileimatut dNTP-nukleotidit eli fluorokromit. Koko DNA-materiaalin kattavan sitoutumisen varmistamiseksi fluorokromien ja dNTP-nukleotidien määrä suhteessa näytteen määrään on yleensä hieman suurempi, joten ylimääräiset pestään leimauksen jälkeen pois. Monivaiheisessa tapahtumasarjassa pesupuskurin pH:n avulla saadaan aikaan leimatun DNA:n sitoutuminen silikapylvääseen, jolloin ylimääräiset nukleotidit ja fluorokromileimat voidaan huuhtoa pois. (Agilent Technologies 2012.)

Kuviossa 6 on esitetty molekyylikaryotyypityksen periaate kaaviona leimausasteesta eteenpäin. Tutkittava DNA ja normaalia ihmisen genomia edustava referenssi-DNA merkitään eri värejä fluoresoivilla leimoilla ja hybridisoidaan mikrosirulle, jolla ne sitou-

tuvat mikrosirun oligokoettiin kilpailevan sitoutumisen periaatteella. Oligokoettimet ovat kaupallisia, ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium) -standardin mukaisesti valikoituja muutaman emäksen pituisia nukleotidijaksoja, jotka kattavat kaikki eksonit painottuen erityisesti tunnettujen geenien, promootorien ja telomeerien alueille. Yhdellä mikrosirulla oligokoettimien lukumäärä vaihtelee, saatavilla on useiden kymmenen tuhansien koettimien mikrosiruista aina miljoonan koettimen siruihin. (Agilent Technologies 2012.) Käyttötarkoituksesta riippuen oligokoettimet voivat edustaa myös muita genomin osia.



Kuvio 6. Molekyylikaryotyypitys mikrosirulla (Knuutila 2006).

DNA sisältää paljon toistojaksoja, joiden näkyminen tuloksissa estetään denaturoimalla DNA-juosteet ja kiinnittämällä haluttuihin kohtiin toistojaksoista koostuvaa DNA-valmistetta (Agilentin menetelmässä Human Cot-1 DNA®) sekä Blocking Agent-valmistetta. Tämän seurauksena toistojaksot eivät pääse sitoutumaan mikrosirun oligokoettiin. DNA renaturoidaan, jonka jälkeen DNA on valmis hybridisaatioon. Hybridisaatio mikrosirulle tapahtuu 65 °C:n lämpötilassa 24 tunnin ajan. Korkea lämpötila takaa DNA-juosteiden pysymisen denaturoituneina koko tapahtuman ajan ja pitkällä hybridisaatioajalla varmistetaan, että mahdollisimman suuri osa leimatusta DNA:sta sitoutuu oligokoettiin. (Agilent Technologies 2012.)

Mikrosiru luetaan laserskannerilla, joka muodostaa värillisen korkearesoluutioisen kuvan koetinpisteiden fluoresenssin voimakkuuden perusteella. Kuvan sisältämät tiedot muutetaan numeeriseen muotoon valitun kuva-analyysiohjelman avulla. Tulokset normalisoidaan vähentämällä fluoresenssisignaalin intensiteettiarvosta taustakohinan aiheuttama signaalin intensiteetti. Normalisoinnin tarkoituksena on muokata epätasaisesti jakautuneet signaalien intensiteettiarvot lähemmäs normaalijakaumaa, jotta tulosten analyysi tilastollisten menetelmien avulla olisi mahdollista. Intensiteettiarvojen perusteella lasketaan suhdeluku (alla olevassa kaavassa logaritminen suhde), jotta jakaumasta saadaan symmetrinen. Logaritminen muunnos (\log_2) lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\text{Logaritminen suhde} = \log_2 \left(\frac{\text{referenssi-DNA}}{\text{tutkittava DNA}} \right)$$

Suhdeluku kuvaa tutkittavan näytteen kopiomäärää suhteessa normaaliin genomin kopiomäärään. Logaritmisin muunnoksen jälkeen normaalin kopiomäärän suhdeluvuksi tulee 0, vahvistuneet signaalit (amplifikaatiot) ovat positiivisia lukuja ja vaimentuneet signaalit (deleetiot) negatiivisia. Kopiomäärämuutoksen koko ja sijainti saadaan selville kromosomiraidan tarkkuudella. (Suominen ym. 2010: 206–210; Tyybäkinoja – Knuutila 2006.) Tulosten tulkinnasta kerrotaan tarkemmin luvussa 6.3.

5.2 Menetelmään vaikuttavat tekijät

Mikrosirutekniikkaan liittyy joitakin rajoituksia. Menetelmällä voidaan havaita ainoastaan geneettisen materiaalin kopiomäärän muutoksia, joten translokaatiot, inversiot ja fuusioitumalla syntyneet geenit tulee osoittaa muilla menetelmillä (esimerkiksi FISH, kohdistettu syväsekvensointi). Vähintään 30 %:ssa tutkittavan näytteen soluista tulee esiintyä kopiomäärän muutos, jotta poikkeavuudesta muodostuu havaittavissa oleva signaali. (Knuutila 2012b.) Tähän perustuu näytteiden valinnassa käytetty tuumorikudospitoisuuden kriteeri. Koska parafiinileikkeistä eristetty DNA on laadultaan heikompaa kuin verestä eristetty DNA, hybridisaatioreaktiot eivät ole yhtä voimakkaita kuin esimerkiksi verestä eristetyllä DNA:lla. Sen vuoksi aCGH:lla ei pystytä osoittamaan pieniä yhden nukleotidin muutoksia. (Knuutila – Wirtanen 2012.)

DNA:n kontaminaatioherkkyys edellyttää genetiikan laboratorioilta asianmukaisia aseptisiä työtapoja. Fluoresoivaa merkkiainetta tulee käsitellä valolta suojattuna, koska fluo-

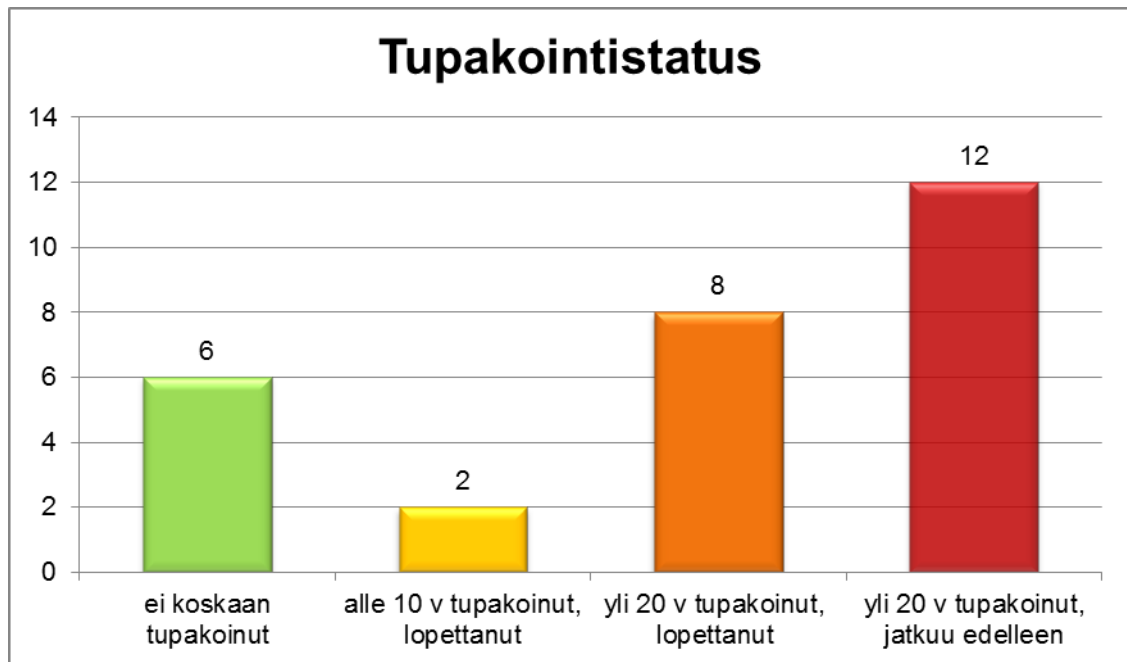
resenssileima reagoi valoon ja siten kuluu ennenaikaisesti. Otsonikadon seurauksena lisääntynyt UVB-säteily katkoo mikrosirun oligokoettimiin sitoutuneen DNA:n vetysidoksia. Tämän vuoksi otsonin määrä tulisi mitata siinä vaiheessa, kun mikrosirulle kiinnittymättömät, ylimääräiset leimatut nukleotidit pestään pois. Otsonin määrän ylittäessä tietyn pitoisuuden (Agilentin menetelmällä $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) on suositeltavaa käyttää erillistä otsonisuojaa. (Agilent Technologies 2012.)

6 Toteutus

Tässä osiossa on kuvattu, miten tutkimus toteutettiin käytännössä. Työ on suoritettu CMG-laboratoriossa kevään 2013 aikana. Näytemateriaali on CMG-laboratorion valitsemaa ja eristämää, lukuunottamatta yhtä näytettä, joka on eristetty toteutusprosessin aikana. Array-CGH on laboratorioprosessina pitkäkestoinen, työvaiheiden suunnittelu mukaan lukien prosessiin käytettiin aikaa neljä työviikkoa, eli noin viisi työpäivää yhtä näytesarjaa kohden. Tulosten analysointiin aikaa käytettiin kolme työviikkoa.

6.1 Näytemateriaali

Opinnäytetyön aineistona käytettiin formaliinifiksoidusta, parafiiniin valetusta (FFPE) keuhkotuumorikudoksesta eristettyä DNA:ta. Otoksen ($n = 28$) kaikki potilaat sairastavat jotakin NSCLC:n alalajia: 82 % näytteistä oli adenokarsinoomaa, loput vaihtelevasti muita alatyyppejä kuten esimerkiksi suurisoluista keuhkosityöpää. Suurin osa potilaista oli jossain vaiheessa elämänsä tupakoinut, kuviossa 7 on havainnollistettu miten otos jakautui tupakoiviin ja tupakoimattomiin.



Kuvio 7. Näytteiden tupakointitiedot.

Käytettävä aCGH-menetelmä vaatii, että näytteen tuumorikudospitoisuuden on oltava vähintään 30 %, tutkimukseen valituissa näytteissä tuumoripitoisuudet vaihtelivat 40:stä 90 prosenttiin. Tutkimuksen kohteena oleva DNA oli eristetty CMG-laboratoriossa tuumorikudosblokeista 27.6.–3.10.2012 välisenä aikana, mutta yhdestä näytteestä (LC24) jouduttiin eristämään lisää DNA:ta näytteen niukkuuden vuoksi. Eristyksessä käytettiin Qiagenin QIAamp DNA Mini Kit -eristyspakkausta. Analyysissä käytettävänä referenssi-DNA:na toimi Agilentin valmistama kaupallinen tuote.

Ennen aCGH-tutkimusta DNA-näytteistä on jo tehty Suomen molekyyli lääketieteen instituutissa (FIMM) sekvensointi Next Generation Sequencing -menetelmällä. (Knuutila – Wirtanen 2012.) Näytteet oli eristysvaiheessa numeroitu LC-tunnisteella (Lung Cancer + satunnainen näytenumero) kolminumeroisen koodin lisäksi. Näytteisiin viitataan tutkimuksessa vain LC-numerolla, koska se on selkeintä ja helpottaa vanhojen tulosten vertailua tämän tutkimuksen tuloksiin.

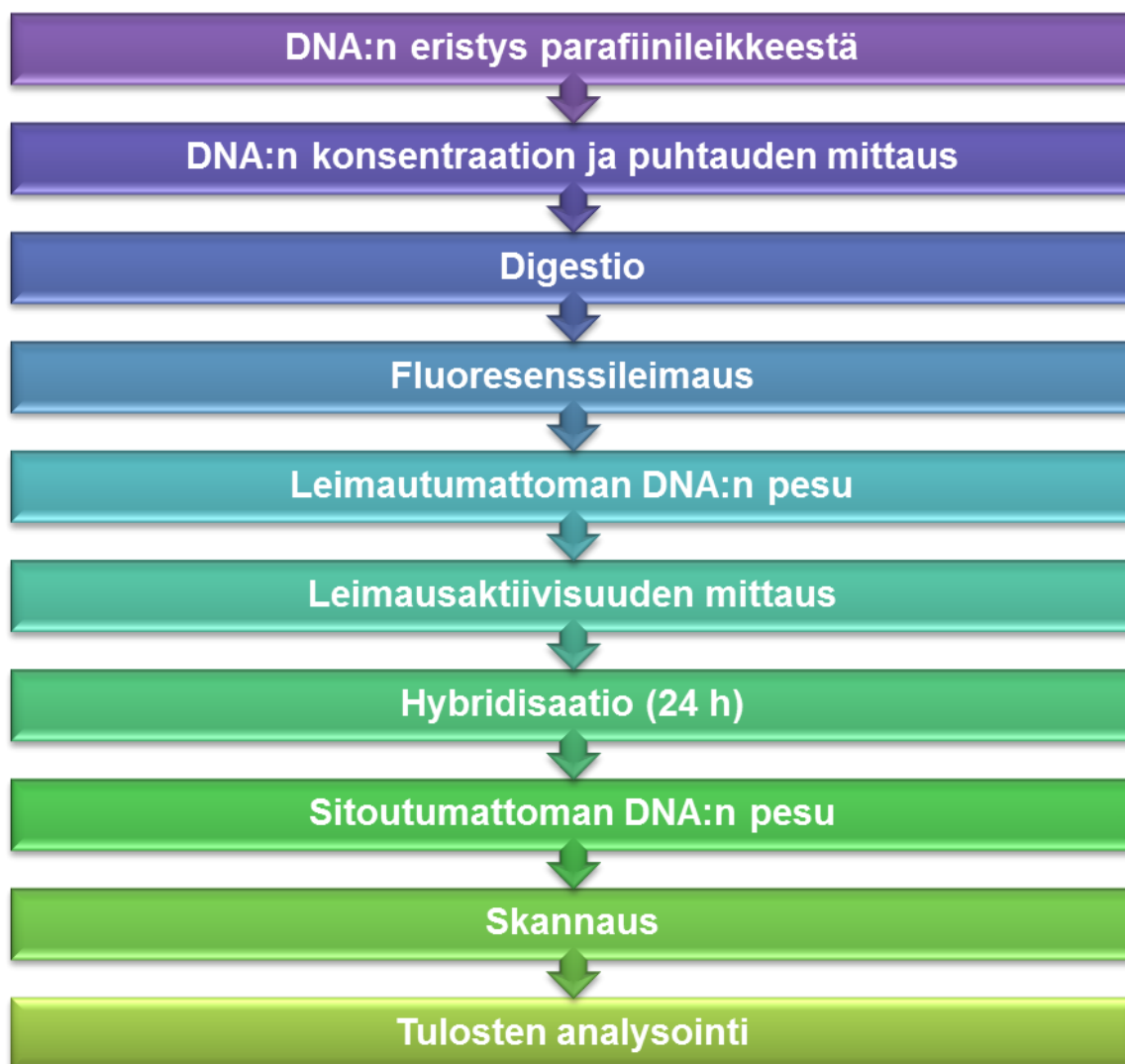
FFPE-näytteet ovat nousseet tärkeäksi lähdemateriaaliksi genetiikan alueella niiden säilyvyyden vuoksi ja potentiaalista tutkimusmateriaalia löytyykin runsaasti arkistoista ympäri maailman. Parafiiniin valetuista kudosteikkeitä eristetty DNA ei kuitenkaan vastaa laadultaan täysin esimerkiksi verestä eristettyä DNA:ta. Koska FFPE-näytteet aiheuttavat aCGH:ssa jonkin verran taustakohinaa, tulosten analysointi voi olla varsinkin kokemattomammille haastavaa. Näyttemateriaalin käyttöä vaikeuttaa myös formaliini-

niin fiksoitumisesta johtuvat molekyyllitason muutokset, kuten esimerkiksi proteiini-proteiini tai nukleiinihappo-nukleiinihappo -ristisidokset. (De Witte – Lea-Chou – Collins 2007.)

Mitään varsinaista estettä ei kuitenkaan FFPE-näytteiden käytölle aCGH:ssa ole: DNA:n eristysvaiheessa tehtävä proteinaasi K -digestio hajottaa proteiineja ja haitallisia entsyymejä, RNAasi A taas eliminoi mahdollisen konaminoivan RNA:n. Sopiva eristys-tekniikka voi mahdollistaa hyvinkin korkealaatuisen näyttemateriaalin eristämisen jokseenkin vanhoista parafiinikudosblokeista. (Pikor – Enfield – Cameron – Lam 2011.)

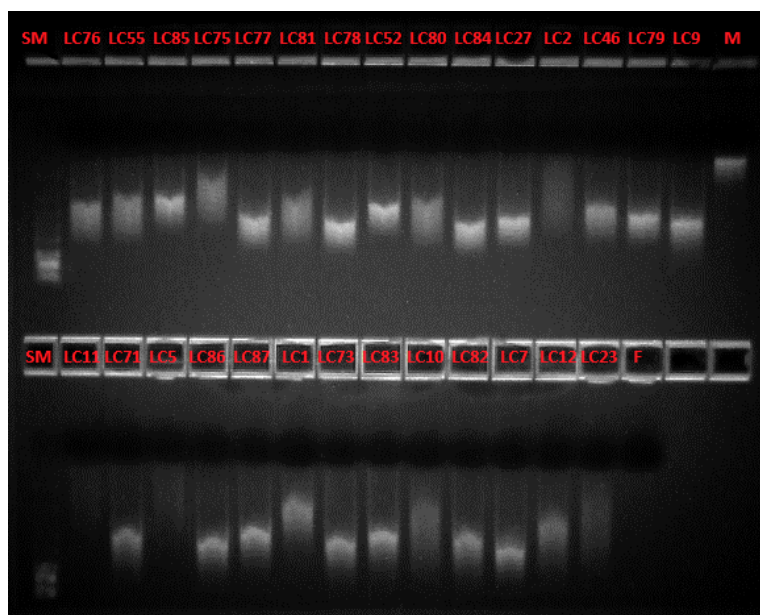
6.2 Työn suoritus

Tutkimusprosessissa käytettiin Agilentin aCGH-tutkimusta varten valmistamia laitteita ja reagenssipakkauksia ja elektroforeesigeelijaan Lonza FlashGel® -laitetta ja -reagensseja. Näytteiden prosessointi suoritettiin pääosin menetelmäkohtaisia työohjeita noudattaen ja poikkeamista olemme maininneet erikseen. Laboratoriopäiväkirja LOT-numeroineen on liitteessä 1. Työ tehtiin käytetyn 8x60K-mikrosirun kokorajoituksen vuoksi kahdeksan näytteen ja kahdeksan referenssi-DNA -näytteen sarjoissa. Viimeisessä sarjassa hyödynnettiin mikrosirun ylimääräisiä näytepaikkoja ja analysoitiin uudelleen neljä potilasnäytettä. Näytteet jaettiin sarjoihin alkuperäisputken kolminumeroisen juoksevan järjestysnumeron mukaan numerojärjestyksessä. Kuviossa 8 on esitetty aCGH-prosessi kokonaisuudessaan. Seuraavassa osiossa esitellään tarkemmin jokainen ensimmäisen näytesarjan työvaihe.



Kuvio 8. aCGH:n laboratorioprosessin vaiheet (Agilent Technologies 2012).

Vaikka näytteiden DNA:n puhtausaste ja DNA-pitoisuus oli jo aikaisemmin mitattu, kaikki näytteet mitattiin uudelleen ennen prosessin alkua, jotta saataisiin varmuus DNA:n laadukkuudesta ja soveltuvuudesta aCGH-tutkimukseen. Mittaus suoritettiin NanoDrop ND-1000 -spektrofotometrillä, joka laskee DNA-konsentraation automaattisesti nanogrammina mikrolitraa kohden (ng/μl). Puhtaan proteiini- ja kontaminanttivapaa DNA:n suhdeluku on 1,8–2,0, jonka laite laskee absorbanssiarvojen A260 ja A280 avulla. DNA:n fragmentoituminen tarkistettiin elektroforeesilla 1,2 % agarosigeeleissä. Tulokset olivat reaaliaikaisesti nähtävissä FlashGel Capture® -ohjelman avulla. 28 näytteestä kaksi alitti hieman suositellun puhtausrajan, mutta koska näiden DNA-konsentraatiot olivat riittävät, päätettiin, ettei niitä sen vuoksi hylätä. Elektroforeesigeelien perusteella näytteissä ei ollut havaittavissa fragmentoitumista (kuvio 9), joten kaikki näytteet hyväksyttiin jatkotutkimuksiin.

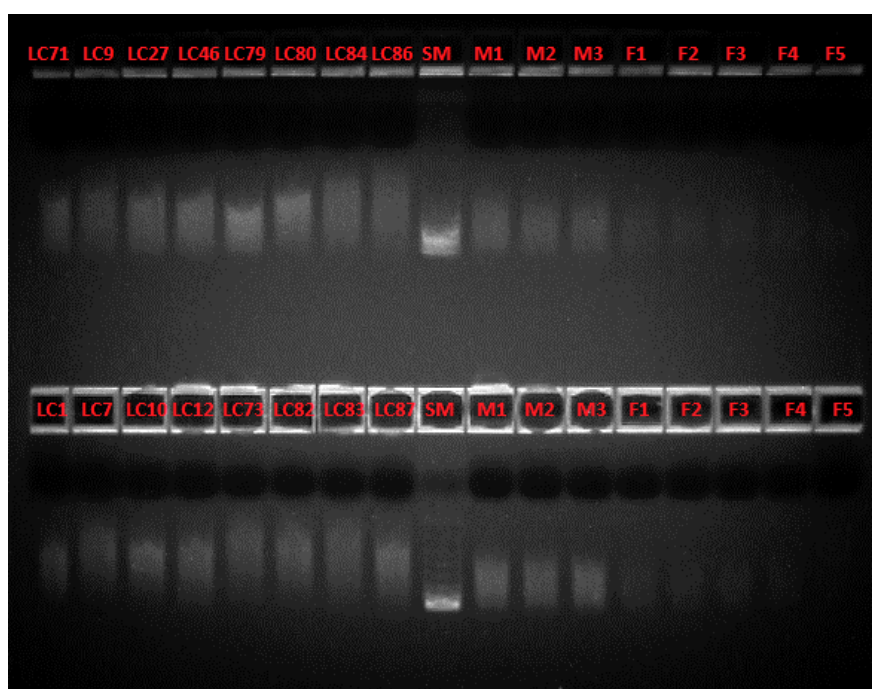


Kuvio 9. Esimerkki FlashGel® -elektroforeesigeelijaon tuloksesta. Kuvassa kaikki potilasnäytteet (LC-numeroidut), referenssi-DNA-näytteet (M=mies, F=nainen) sekä kokomarkkeri (SM). DNA:ssa ei ole havaittavissa fragmentoitumista.

Jokaista tutkittavaa potilasnäytettä kohden tarvittiin samaa sukupuolta edustavan referenssi-DNA-näytteen, jonka pitoisuus ja fragmentoituminen mitattiin edellä mainitulla tavalla. Referenssinä käytettiin Agilentin valmistamaa kaupallista DNA:ta nimeltään Human Reference DNA Male/Female. Agilent ilmoittama referenssi-DNA:n vakiopitoisuus on 200 ng/μl (Agilent Technologies 2012). Tämä tarkistettiin spektrofotometrimittauksella, josta saatu tulos oli hieman matalampi, mutta tämä otettiin huomioon laskettaessa tarvittavaa DNA:n määrää seuraavassa työvaiheessa.

Tutkittavan DNA:n konsentraation pitää olla samassa suhteessa referenssi-DNA:n konsentraation kanssa, jotta tulos on mahdollista tulkita oikein. Huomattavasti epäsuhtainen nukleotidien määrä näkyy tulosten analyysivaiheessa suoraan kopiomäärän muutoksena. (Agilent Technologies 2012.) Tämän vuoksi näytteitä laimennettiin nukleasivapaalla vedellä siten, että lopullinen saanto näytteen vakiotilavuudessa (10,1 μl) on 500 ng DNA:ta. Näytteistä kolme oli konsentraatioltaan huomattavasti referenssi-DNA:ta alhaisempia, joten niitä ei laimennettu, vaan referenssi-DNA:ta laimennettiin vastaamaan näiden näytteiden konsentraatiota. Laimennukset laskettiin mitatun DNA:n konsentraation perusteella, laskukaavat ovat laboratoriopäiväkirjassa liitteessä 1.

Digestio master mix valmistettiin SureTag® DNA Labeling Kit -reagenssipakkauksen sisältämistä tarvikkeista sekä nukleasivapaasta vedestä. Jokaiseen näytteeseen ja referenssiin lisättiin 2,9 µl master mixiä ja ne pantiin 37 °C:n vesihauteeseen 2 tunnin digestion ajaksi. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin vielä 20 minuuttia 65 °C:n lämpölevyllä entsyymiaktiivisuuden lopettamiseksi. Restriktioentsyymeitä on monia erilaisia; tässä tutkimuksessa käytetyn Agilentin menetelmän entsyymit ovat Alu I ja Rsa I, jolloin tuloksena on 200–500 emäsparin mittaisia DNA-juosteita. Alu I katkaisee DNA-juosteen kohdasta AG|CT 5' päästä, Rsa I vastaavasti kohdasta GT|AC 5' päästä. Asetyloitu BSA stabiloi entsyymiaktiivisuuden digestiovaiheessa ja restriktioentsyymipuskuri luo optimi-olosuhteet digestioreaktiolle. Restriktioentsyymi toimii 37 °C lämpötilassa. Juosteiden renaturaation estämiseksi näytteiden annettiin viilentyä jäähauteella viiden minuutin ajan. Digestion onnistuminen tarkistettiin Lonzan FlashGel® -elektroforeesigeelillä (kuvio 10) ja kaikkien näytteiden todettiin olevan jatkokelpoisia. Onnistuneessa digestiossa DNA-juosteiden tulisi olla 200–500 emäsparin pituisia. (Agilent Technologies 2012; Suominen ym. 2010: 112–121.) Digestion jälkeen näytteet siirrettiin pakastimeen säilytykseen, mikäli samana päivänä ei jatkettu seuraavaan työvaiheeseen.

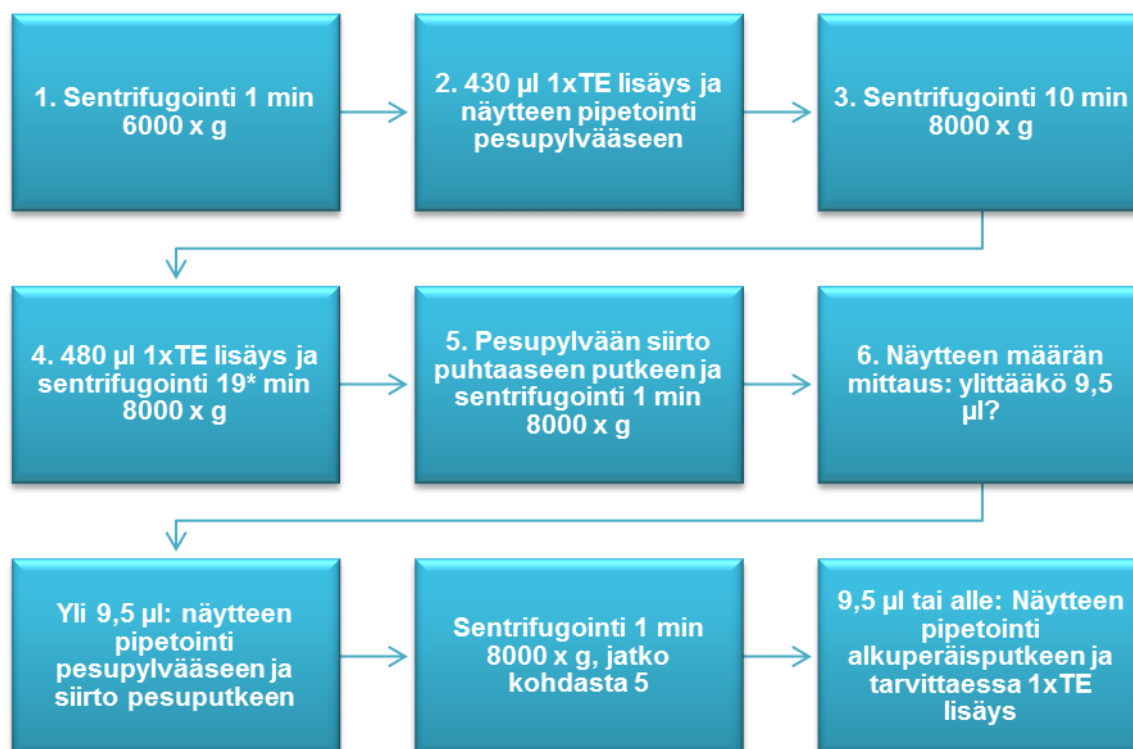


Kuvio 10. Esimerkki digestiovaiheen jälkeisestä FlashGel® -elektroforeesigeelijon tuloksesta toisen ja kolmannen näytesarjan osalta. Kuvassa potilasnäytteet (LC-numeroidut), referenssi-DNA-näytteet (M=mies, F=nainen) sekä kokomarkkerit keskellä (SM). DNA:ssa ei ole havaittavissa fragmentoitumista.

Agilentin menetelmän käyttämät fluoresenssileimat ovat Cyanine 3-dUTP ja Cyanine 5-dUTP. Cy-5 ja Cy-3 -fluorokromimolekyyleissä urasiilin 11-aseman hiileen on lisätty biotiini, jonka avulla se kiinnittyy nukleotidiin. (Suominen ym. 2010: 195–200.) Leimausvaiheen aluksi lisättiin 2,5 µl random primeriä ja näytteitä inkuboituihin 95 °C:n lämpölevyllä 3 minuutin ajan. Seuraavan master mixin valmistuksen ajan, noin 5 minuuttia, näytteiden annettiin jäähtyä jäällä, jotta exo(-) Klenow ei alkaisi toimia ennenaikaisesti.

Molemmista fluorokromeista valmistettiin oma Labeling master mix SureTag® DNA Labeling Kit -reagenssipakkauksen sisältämistä tarvikkeista sekä nukleaasivapaasta vedestä. CMG-laboratorion käytäntönä on leimata tutkittava näyte siniseksi Cy-3-fluorokromilla ja referenssi punaiseksi Cy-5-fluorokromilla, joten tutkimuksessa käytämme tätä vakiintunutta tapaa. Jokaiseen digestoituun potilasnäytteeseen lisättiin 11,5 µl Cy-3-leimaa sisältävää master mixiä ja vastaavasti jokaiseen digestoituun referenssinäytteeseen saman verran Cy-5-leimaa sisältävää master mixiä. Leimautuminen tapahtuu 37 °C:n lämpötilassa, näytteet pantiin 2 tunnin ajaksi vesihauteeseen, minkä jälkeen näytteitä inkuboituihin vielä 10 minuuttia 65 °C:n lämpölevyllä. Tämän jälkeen näytteet siirrettiin pakastimeen säilytykseen.

Leimautumaton DNA pestiin näytteistä ja referensseistä kuvion 11 mukaisesti. Lähes kaikille näytteille tehtiin lisäsentrifugointivaihe, koska näytteen volyyymi ylitti sallitun raja-arvon. Pesupuskurina käytettiin yksinkertaista Tris-EDTA-liuosta (TE), jonka pH on 8,0.



Kuvio 11. DNA:n pesun vaiheet lisäsentrifugointineen. Agilentin menetelmäohjeesta poiketen tähdellä (*) merkittyä sentrifugointiaikaa on pidennetty, koska ohjeen mukainen 10 minuutin sentrifugointi ei ollut riittävä poistaakseen kaiken ylimääräisen eluaatin. Tavoitteena on saavuttaa kaikille näytteille vakiotilavuus 9,5 µl. (Agilent Technologies 2012.)

Pesun jälkeen mitattiin NanoDrop ND 1000 -spektrofotometrillä sitoutuneen fluoresenssin absorbanssi ja DNA:n konsentraatio, joiden perusteella laskettiin leimautumisaste, aktiivisuus ja saanto. Laskukaavat löytyvät laboratoriopäiväkirjasta liitteestä 1. Suositeltava aktiivisuus on Cy-3-leimatuilla näytteillä 20–35 pmol/µg ja Cy-5-leimatuilla 20–30 pmol/µg ja suositeltava saanto kaikilla 8–11 µg (Agilent Technologies 2012). Potilasnäytteistä noin 32 % (18 näytettä) ja referensseistä noin 20 % (11 näytettä) olivat suositelluissa raja-arvoissa. Saanto oli suositeltua tasoa alhaisempi kaikilla näytteillä ja referensseillä. CMG-laboratorion käytännön kokemuksen mukaan tulokseksi saadut aktiivisuus- ja saantoarvot olivat tyypillisiä parafiiniblokeista eristetyille näytemateriaalille. Prosessia jatkettiin kaikkien näytteiden osalta.

Aktiivisuustietojen perusteella jokaiselle potilasnäytteelle valittiin sopivan referenssi-DNA-parin. Aktiivisuus vaihteli näytteiden välillä suuresti, joten potilasnäytteet ja referenssit järjestettiin aktiivisuudeltaan pienimmästä suurimpaan ja parit valittiin tämän

mukaan. Hybridisaatioparit kirjattiin Mikrosirujen pipetointikaaviot -lomakkeille (liite 3). Referenssinäyteputken sisältö lisättiin sitä vastaavaan potilasnäyteputkeen, jonka jälkeen DNA:n määrä mitattiin. Yksinkertaista TE-puskuria lisättiin siten, että yhteiseksi tilavuudeksi saatiin vakio 16 µl, ja näytteet siirrettiin pakastimeen säilytykseen.

Hybridisaatio master mixin valmistuksessa lisättiin Agilentin menetelmäohjeessa annettuun määrään 5 µl ylimääräistä reaktiota kohden, koska sen todettiin haihtuvan toivottua enemmän 95 °C:n inkubaation aikana. Hi-RPM-puskurin runsaan vaahtoamisen takia mixiin lisättiin vielä yksi ylimääräinen reaktio pipetointivaraksi. Jokaiseen näytteeseen ja referenssiin lisättiin 34 µl master mixiä. DNA-juosteiden denaturoimiseksi näytteitä inkuboititiin 95 °C:n lämpölevyllä 3 minuuttia ja renaturoimiseksi sen jälkeen 37 °C:n vesihauteessa 30 minuuttia. Näytteitä sentrifugoitiin 1 minuutin ajan 6000 x g:n nopeudella, jonka jälkeen ne olivat valmiita mikrosirulle pipetoitavaksi.

Hybridisaatiossa käytetyt mikrosirut olivat Agilentin SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit 8x60K, joissa on kahdeksan 60 000 oligokoetinta sisältävää näyteleikkaa (Agilent Technologies 2012). Mikrosirun silikoniesteillä rajattuun näyteleikkaan pipetoitiin 45 µl näytettä, ilmakuplat puhkottiin steriilillä neulalla ja peitinlasi asetettiin suojaamaan näyteleikkoja. Mikrosiru koottiin ohjeen mukaisesti tiiviisti suljettuun hybridisaatiokammioon ja näytteiden vapaa liikkuvuus mikrosirun ja peitinlasin välissä varmistettiin. Hybridisaatio tapahtui hybridisaatiouunissa 65 °C:n lämpötilassa 24 tunnin ajan.

Kun hybridisaatio oli valmis, otsoniarvo tarkistettiin. Otsonin ollessa Agilentin ilmoittamia raja-arvoja korkeampi lisätään mikrosirun päälle erillinen otsonisuoja. Kaikkien mikrosirujen kohdalla otsonilukemat jäivät alle sallitun 50 µg/m³:n rajan, joten suojausta ei tarvittu. Sitoutumattomien nukleotidien pesu tehtiin kuvion 12 mukaisesti.



Kuvio 12. Sitoutumattomien nukleotidien pesuprosessi hybridisaation jälkeen (Agilent Technologies 2012).

Pesty mikrosiru kuljetettiin valolta foliokuoressa suojattuna Biomedicumiin, jossa se skannattiin Agilentin korkean resoluution SureScan DNA Microarray Scanner -laserskannerilla. Skannerin asetuksen olivat Agilentin 8x60K -kokoiselle mikrosirulle suosittelemat. Heti näytesarjan skannauksen jälkeen varmistettiin skannauksen onnistuminen skannatusta kuvatiedostosta sekä tarkistettiin, ettei ohjelma ollut antanut virheilmoituksia. Feature Extraction -ohjelman avulla skannerin ottama kuvatiedosto muunnettiin tulosten analysointiin käytettävän ohjelman ymmärtämään muotoon eli numeeriseksi tekstitiedostoksi. Tämän jälkeen mikrosirun skannaustulokset olivat valmiita analysoitaviksi.

Ennen viimeisen näytesarjan prosessointia sekä tulosten analysointivaihetta tarkastettiin alustavasti siihen mennessä edellisten sarjojen kaikki näytteet ja niiden laaduntarkailuraportit (myöhemmin QC-raportit) (liite 5). Näiden raporttien tietojen perusteella valittiin viimeiseen näytesarjaan uusittavat näytteet. QC-raporteista tarkistettiin fluoresenssisignaalien intensiteetti ja taustakohinan määrä sekä näytteen jakaantuminen mikrosirun oligokoettimille (näkyvissä myös yllä olevassa kuvassa 11). Hajonnan suositusarvo on alle 0,30, intensiteetin yli 50 ja taustakohinan alle 15 (Agilent Technologies 2012). Lisäksi tarkistettiin analyysiohjelman (CytoGenomics) avulla, onko näyte mahdollisista laatupoikkeavuuksista huolimatta tulkittavissa ja onko sen uusiminen tutkittavien kopiomäärämuutosten kannalta kannattavaa. Mikrosirun ylimääräisten näytepaikkojen perusteella oli mahdollisuus uusita korkeintaan neljä näytettä ja nämä kaikki uusintamahdollisuudet käytettiin, vaikka ehdottomasti uusintaa vaativia näytteitä olikin vain kolme.

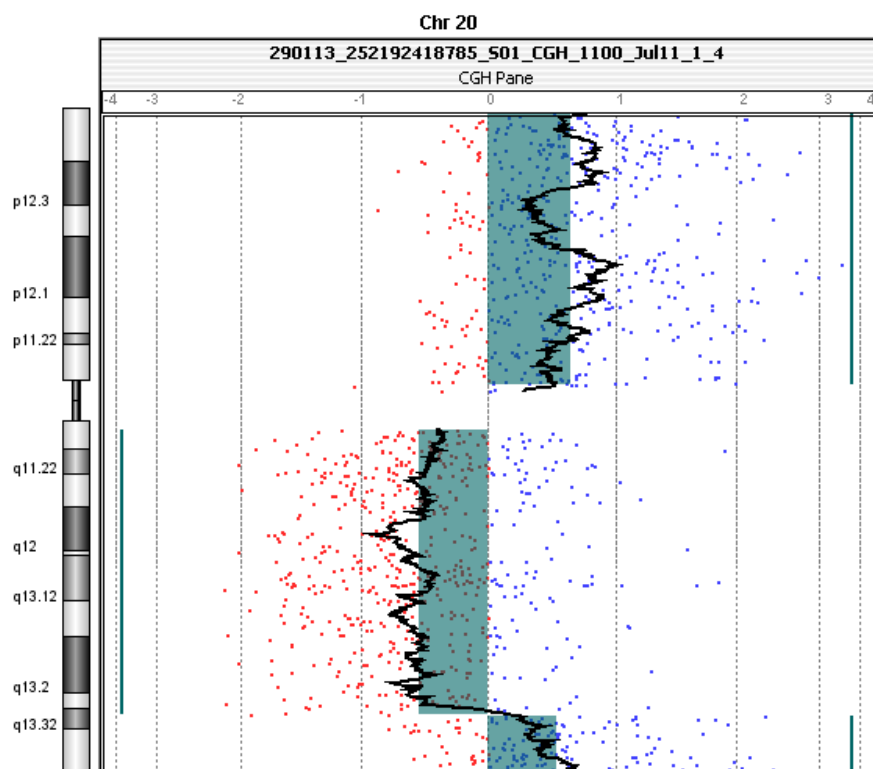
6.3 Tulosten analysointi

Tulosten analysointiin käytettiin Agilentin CytoGenomics -ohjelmaa (versio 2.0) sekä Zürichin yliopiston kehittämää ja ylläpitämää Progenetix -ohjelmaa. Kuviossa 13 on esitetty tulosten analysointiprosessi kokonaisuudessaan.



Kuvio 13. aCGH-tulosten analysointiprosessin vaiheet. Opinnäytetyöhömmme kuuluu ensimmäiset neljä vaihetta (sininen väri). Näytteiden osalta tutkimusprosessi jatkuu vielä (violetti väri).

CytoGenomics järjestää mikrosirun oligokoettimet automaattisesti idiogrammin eli kromosomiraitamallin mukaisesti, jolloin voidaan tarkastella näytettä genomi-, kromosomi- ja geenitasolla. CytoGenomics ilmoittaa skannerilla kuvatut ja numeeriseksi tiedoksi muokatut tulokset sekä graafisena kuvana että tunnuslukuina. Kuviossa 14 on esitetty graafinen kuva kopiömäärän poikkeavuuksista kromosomi- ja geenitasolla. Ohjelmaan voidaan määritellä kopiömäärämuutosalueen vähimmäiskoko, jolloin kaikki nämä arvot ylittävät muutokset tulkitaan poikkeavuuksiksi ja merkitään visuaalisesti helpommin havaittaviksi. Asetukset olivat Agilentin (2012) suosituksen mukaiset, jolloin peräkkäisten koettimien vähimmäismäärä on 3 ja log ratio 0,25.



Kuvio 14. Esimerkki CytoGenomics -ohjelman tuloksesta. Graafisessa kuvassa on esitetty kopiomäärämuutokset kromosomin tasolla. Punaiset pisteet kuvaavat deleetioita ja siniset amplifikaatioita. Kuvion keskellä on liukuva keskiarvo (average log ratio) -käyrä, joka ilmoittaa kopiomäärämuutoksen koon suhteessa normaaliin kopiomäärään. (Agilent Technologies 2012.)

CytoGenomics -ohjelma ei tee tulkintoja kopiomäärämuutoksen aiheuttajasta, joten ohjelman merkitsemien muutoskohtien oikeellisuus on aina arvioitava tapauskohtaisesti. Tämä tutkimus kohdistuu kopiomäärämuutoksiin ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä, joten CytoGenomicsin löytämistä poikkeamista suodatettiin normaaliin perimän variaatioon kuuluva polymorfismi. Ohjelman tietokantayhteyden avulla verrattiin poikkeavuusalueita sekvensoituun normaaliin ihmisen genomiin, lähdetietokantana käytettiin ihmisen genomin tietokantaa hg19. Tuloksista suodatettiin myös poikkeavuudet, jotka johtuvat muista tekijöistä kuin todellisesta kopiomäärän muutoksesta perimässä.

FFPE-näyttemateriaali aiheuttaa tavallista suurempaa taustakohinaa, mikä voi saada aikaan virheellisiä log ratio -arvoja ja siten näyttää kopiomäärämuutokselta, joten tällaiset pyrittiin myös karsimaan. Virheellisten tulosten suodattamisessa otettiin myös huomioon paljon geneettistä variaatiota sisältävät alueet, esimerkiksi kromosomien telomeerit ja sentromeerit ja suhtauduttiin kriittisemmin näiltä alueilta löytyneisiin poikkeavuuksiin. Muutosalueen koon eli alueen sisällä olevien emäsparien määrän sekä

poikkeavuuden rekisteröineiden koettimien määrän otettiin myös huomioon, erityisesti mikäli kyseessä oli kooltaan pieni muutosalue.

Potentiaalisista kopiomäärämuutoksista tehtiin ISCN 2009 -nomenklatuurin mukaiset potilaskohtaiset karyotyypit (liite 4). Karyotyypeistä selviää onko kyseessä deleetio vai amplifikaatio, kuinka laaja alue on kyseessä, mistä kromosomista muutos löytyy ja onko muutos kromosomin p- vai q-varressa. (Shaffer – Slovak – Campbell 2009: 121–128.) Progenetix -ohjelman avulla etsittiin kopiomäärämuutoksista näytteiden kesken yleisimmin toistuvat, yhteiset kromosomialueet. Saatua tuloksia verrattiin Progenetixin tutkimustulostietokantaan, jossa on aikaisemmin osoitettuja ei-pienisoluiheen keuhkosyöpään liittyviä kopiomäärämuutoksia. Tämän vertailun tulokset on esitetty tulostulosten yhteydessä luvussa 7.

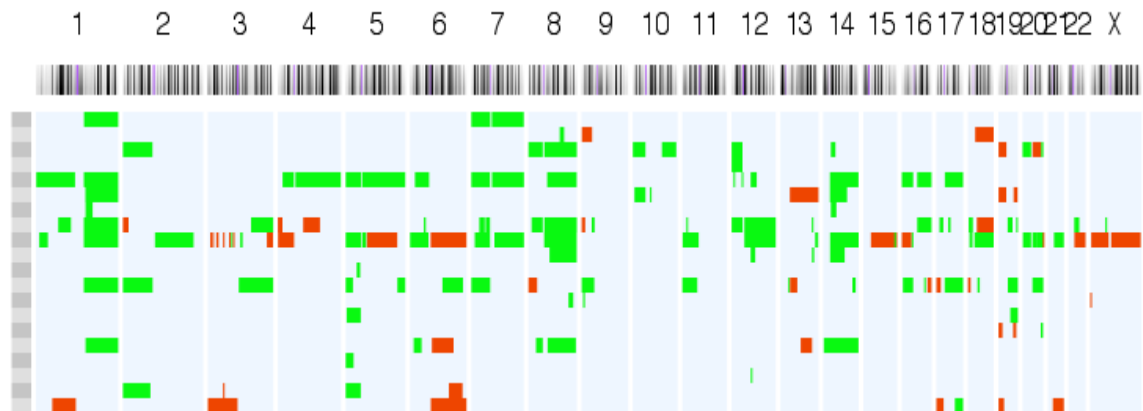
Näytteiden NGS-sekvensointitulosten perusteella oli valittu neljä ei-pienisoluiheen keuhkosyöpään liittyvää geeniä: ALK, BRAF, EGFR ja KRAS. OMIM-geenitietokannasta etsittiin näiden geenien sijainti ja sitä verrattiin kopiomäärämuutos-tuloslistaan. Löydettyjä kopiomäärämuutoksia verrattiin myös potilasnäytteiden sekvensointituloksiin näiden geenien osalta. Apuna kopiomäärämuutosten luetteloinnissa käytettiin Microsoft Officen Excel -taulukkolaskentaohjelmaa.

7 Tulokset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli osoittaa aCGH-menetelmällä 28 potilasnäytteestä geenien kopiomäärämuutoksia. Kopiomäärämuutoksiksi tulkituista amplifikaatioista, deleetioista ja amplikoneista etsittiin sen jälkeen kaikkien potilasnäytteiden tuloksissa eniten toistuvat kromosomialueet. Lisäksi tutkittiin potilasnäytteistä neljän työhön valitun geenin (ALK, BRAF, EGFR, KRAS) mutaatiotietoja ja selvitettiin, löytyykö geenien alueelta myös kopiomäärämuutoksia.

Tutkituista 28 näytteestä 20:ssä oli osoitettavissa yhteensä 166 kopiomäärämuutosaluetta. Näistä 119 (71,7 %) oli amplifikaatioita, 46 (27,7 %) deleetioita sekä 1 (0,6 %) amplikon. Kopiomäärämuutosalueiden koko vaihteli välillä 0,4 Mb – 137,5 Mb. Kuvion 15 havaintomatriisi osoittaa muutosalueiden toistuvuutta näyttemateriaalissa. Muutosten koko ja sijainti vaihtelivat suuresti eri näytteiden välillä, mutta joitakin toistuvia muu-

toksia pystyttiin havaitsemaan. Y-kromosomi ei näy kuviossa sen huonon tulkittavuuden vuoksi.



Kuvio 15. Hajontamatriisi kopiomäärämuutosten koosta ja sijainnista näytekohtaisesti. Jokainen vaakarivi vastaa yhtä potilasnäytettä. Amplifikaatiot on merkitty vihreällä ja deleetiot punaisella, palkin leveys kuvaa kopiomäärämuutosalueen kokoa.

7.1 Karyotyypitys ja yhteiset kromosomialueet

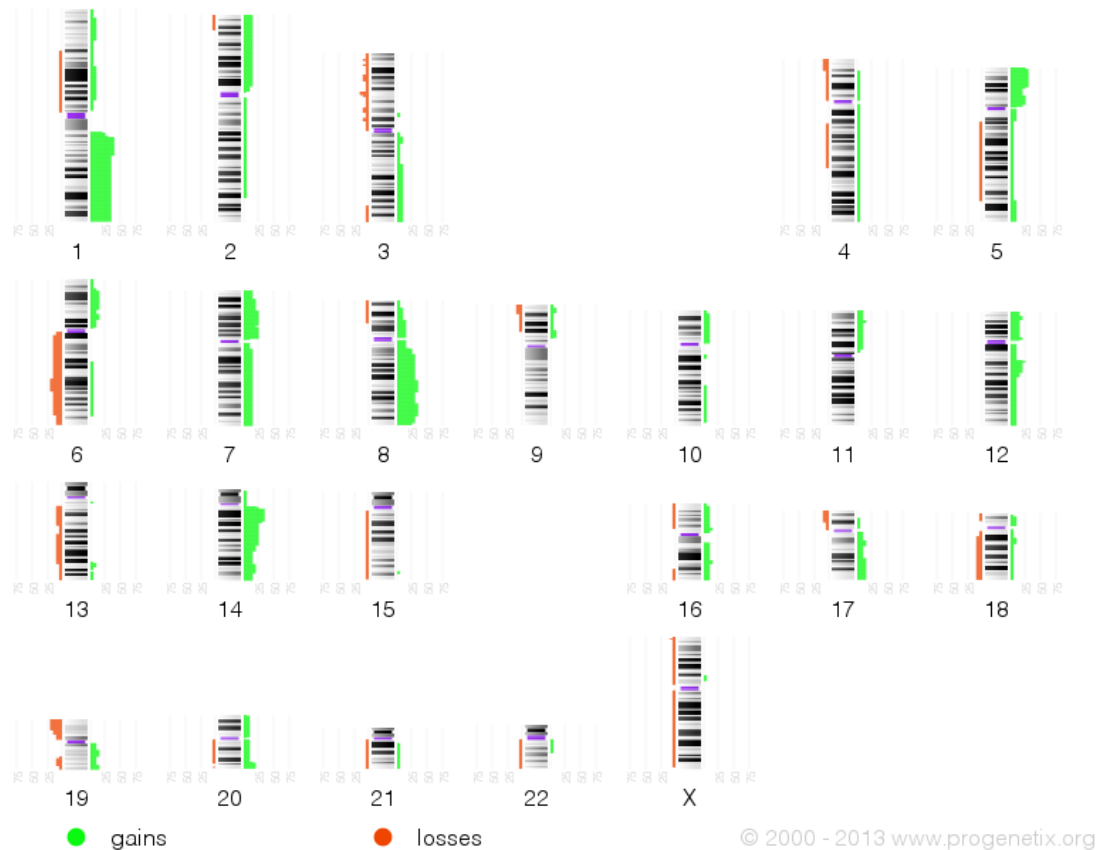
Tutkituista näytteistä kahdeksan oli karyotyypiltään normaaleja, eikä niistä voitu osoittaa potentiaalisia kliinisesti merkityksellisiä geenien kopiomäärämuutoksia. Jokaisesta näytteestä tehtiin karyotyyppi Progenetix-ohjelman ajoa varten. Taulukossa 2 on esitetty esimerkkejä näytteiden karyotyypin merkitsemistavasta ISCN-nomeklatuurin mukaisesti (Shaffer ym. 2009: 121–128).

Taulukko 2. Esimerkkejä näyttemateriaalin karyotypeista.

Näyte	Muutos	Muutosalue
LC9	Normaali	arr(1-22,X)×2
LC55	Normaali	arr(1-22)×2,(XY)×1
LC5	amplifikaatio (x3)	1p31.3p21.1(67,816,733-106,341,021)
LC10	deleetio (x1)	18q11.2qter(21,745,057-77,982,126)
LC5	amplikon (x4)	17q12(35,641,794-37,988,426)

Toistuvimmat kromosomialueet, joissa kopiomäärämuutoksia oli osoitettavissa, olivat kromosomit 1q, 5p, 8q ja 14q. Kaikki nämä muutokset olivat tyypiltään amplifikaatioita ja ne voitiin osoittaa yli 25 %:ssa kopiomäärämuutos-positiivisista näytteistä. Deleetioi-

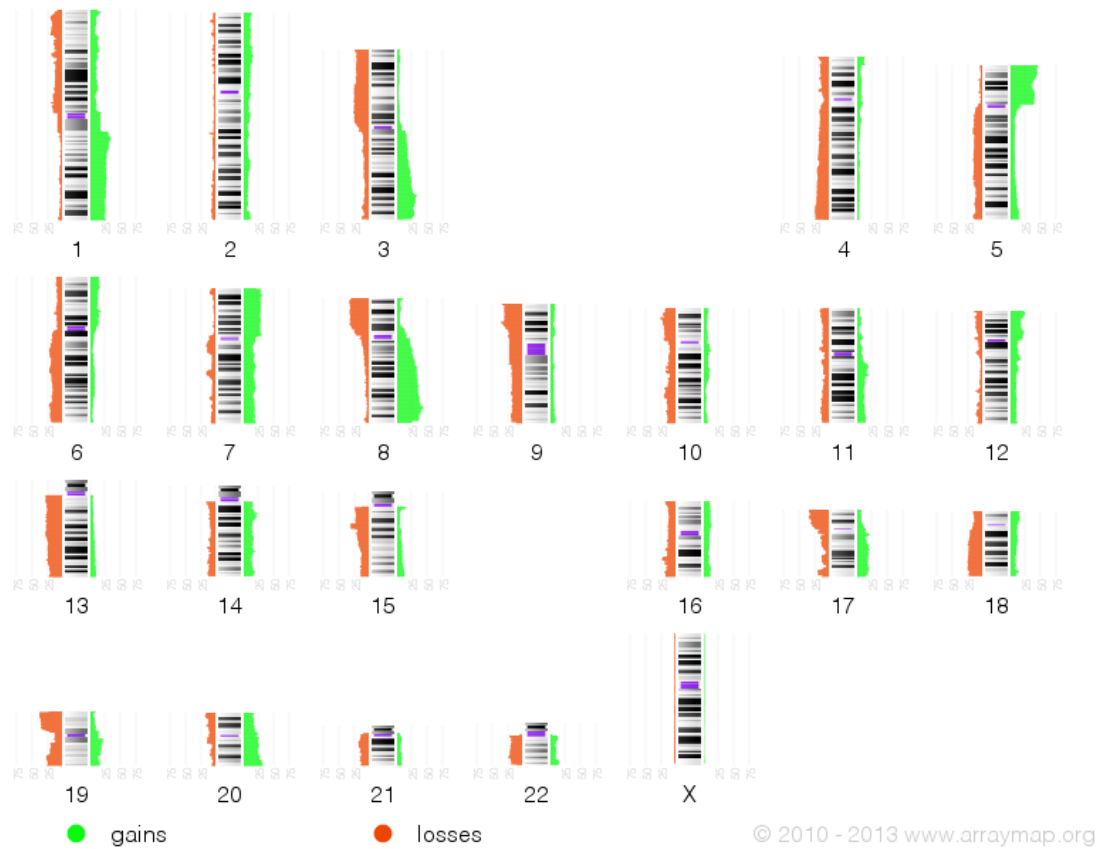
den osalta toistuvuus ei ollut yhtä suurta: noin 20 %:ssa kopiomäärämuutospositiivisista näytteistä oli osoitettavissa deleetioita kromosomeissa 6q ja 19p. Kuviossa 16 on esitetty idiogrammina yhteenveto tutkittujen potilasnäytteiden kopiomäärämuutosalueista ja niiden sijoittumisesta kromosomistoon.



Kuvio 16. Idiogrammi 20 potilasnäytteen geenien kopiomäärämuutosten tuloksista. Amplifikaatiot on merkitty vihreällä ja deleetiot punaisella, palkin leveys kuvaa kopiomäärämuutosten toistuvuutta.

Progenetixin tekijöiden ylläpitämässä arrayMap-tietokannassa on julkaistuja ja validoituja, CGH-menetelmällä analysoituja syöpiin liittyviä tutkimustuloksia koko genomin kopiomäärämuutosten osalta. NSCLC:n CGH-tuloksia on tietokannassa yhteensä 595 ja myös näistä on mahdollista tuottaa idiogrammi. (Baudis 2012a; Cai – Kumar – Baudis 2012.) Tämän tutkimuksen tuloksia voidaan verrata tähän yleiseen profiiliin. Kuviossa 17 on havainnollistettu NSCLC:n tyypilliset kopiomäärämuutosalueet. Verrattaessa tutkimuksen tuloksia näihin tyypillisiin kopiomäärämuutosalueisiin, voidaan havaita alueiden vastaavan toisiaan. Tämän perusteella voidaan todeta tulosten olevan luotettavia ja FFPE-materiaalia on odotetusti voitu käyttää kopiomäärämuutosten osoittamiseen aCGH-menetelmällä.

8046/3: Non-small cell carcinoma (595 samples)



Kuvio 17. Idiogrammi ei-pienisoluisen keuhkosyövän tyypillisestä kopiomäärämuutosjakaumasta 595 potilaan näytteisiin perustuen (Baudis 2012a; Cai – Kumar – Baudis 2012).

Toistuvimpien kopiomäärämuutosten pienimmät yhteiset kromosomialueet (MCR, minimal common regions) on kuvattu taulukossa 3. Amplifikaatioiden osalta tulokset vastaavat aikaisempaa tutkimustietoa. Amplifikaatioalueet kromosomeissa 1q, 5p, 8q ja 14q13.3 sisältyivät vuosina 2007 ja 2010 tehtyjen tutkimusten MCR-alueisiin (Job ym. 2010; Weir ym. 2007: 433–438). Tämän tutkimuksen näytemateriaalista määritetyiltä MCR-alueilta löytyi vain kaksi tunnettua keuhkosyöpään liittyvää geeniä, LNCR1 ja LNCR3.

Taulukko 3. Pienimmät yhteiset kromosomialueet. Mahdolliset alueilla sijaitsevat keuhkosyöpään liittyvät geenit löytyvät sulkeista. Muutos "amp" tarkoittaa amplifikaatiota ja "del" deleetiota. (OMIM 2013.) Sinisellä merkityt amplifikaatioalueet vastaavat aikaisempien tutkimusten tuloksia (Job ym. 2010; Weir ym. 2007: 433–438).

Kromosomiraita	Cytoband	Koko (Mb)	Muutos	Geenejä	Näytteitä
1q21.2q24.3	150,257,376-171,754,884	25,5	amp	297	8
5pterp14.3	151,737-22,246,071	22,1	amp	56 (LNCR3)	6
8q12.3q23.1	63,892,527-107,764,059	46,9	amp	143	7
14q11.2q13.3	23,138,372-37,020,815	13,9	amp	97	7
14q31.3q32.2	88,651,756-98,759,778	10,1	amp	60	4
6q22.1q23.2	117,590,391-131,900,272	14,3	del	55 (LNCR1)	4
19pterp13.2	327,273-12,042,486	11,7	del	226	4

Ainoa tässä työssä löydetty amplikon sijaitsee kromosomissa 17q12 (35,641,794–37,988,426) ja on kooltaan 2,3 Mb. Alueella on 45 geeniä, mutta näiden joukossa ei ole tunnettuja keuhkosyöpään liittyviä geenejä.

7.2 Geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten vertailu

NGS-sekvensointitulosten perusteella EGFR-pistemutaatioita (L858R ja L861Q) oli osoitettu neljästä potilasnäytteestä ja deleetioita (DEL19) kahdesta. Näistä kahdessa näytteessä (LC24 ja LC75) oli osoitettavissa yhtä aikaa saman geenin alueella pistemutaatio L858R sekä kopiomäärämuutos. BRAF-mutaatioita ei sekvensoinnissa osoitettu yhdestäkään potilasnäytteestä. ALK-uudelleenjärjestymä osoitettiin sekvensoinnissa kahdesta näytteestä, mutta kummassakaan ei ollut osoitettavissa saman geenin alueella kopiomäärämuutosta. Erilaisia KRAS-mutaatioita (12ALA, 12ASP, 12CYS ja

12VAL) osoitettiin yhteensä yhdeksästä näytteestä, mutta missään näistä ei ollut osoitettavissa kopiomäärämuutosta KRAS-geenin alueella.

Taulukossa 4 on esitetty vertailu aCGH-menetelmällä osoitettujen kopiomäärämuutosten ja sekvensoinnilla osoitettujen geenimutaatioiden välillä. Vertailu on tehty tutkimukseen valittujen geenien alueelta. Kopiomäärämuutoksia oli osoitettavissa ALK-, BRAF ja KRAS-geenien alueella kolmessa näytteessä kussakin ja kaikki muutokset olivat tyypiltään amplifikaatioita. EGFR-geenin alueella kopiomäärämuutoksia oli osoitettavissa viidessä näytteessä. Seitsemässä potilasnäytteessä ei pystytty osoittamaan geenimutaatiota eikä kopiomäärämuutosta, joten näitä näytteitä ei ole tässä taulukossa esitetty. BRAF- ja EGFR-geenien kopiomäärämuutokset korreloivat huomattavassa määrin: jokaisessa näytteessä, josta osoitettiin BRAF-geenin kopiomäärämuutos, oli muutos myös EGFR-geenin alueella. Muilla kopiomäärämuutosalueilla samanlaista korrelaatiota ei havaittu. Tämän työn aineisto on kuitenkin liian pieni luotettavaan tilastolliseen analyysiin.

Taulukko 4. Potilasnäytteistä osoitettujen kopiomäärämuutosten ja geenimutaatioiden vertailu. X-merkintä tarkoittaa, että kyseisen geenin alueelta on osoitettu kopiomäärämuutos.

KOPIOMÄÄRÄMUUTOKSET					GEENIMUTAATIOT			
Näyte	ALK	BRAF	EGFR	KRAS	ALK	BRAF	EGFR	KRAS
LC1	-	X	X	-	Positiivinen	Normaali	Normaali	Normaali
LC2	-	-	-	X	Normaali	Normaali	Normaali	Normaali
LC5	-	-	X	X	Normaali	Normaali	Normaali	Normaali
LC7	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12ASP
LC9	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12ASP
LC10	-	-	-	-	Normaali	Normaali	DEL 19	Normaali
LC11	-	-	-	-	Positiivinen	Normaali	Normaali	Normaali
LC12	X	-	-	X	Normaali	Normaali	Normaali	Normaali
LC23	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12CYS
LC24	-	X	X	-	Normaali	Normaali	L858R	Normaali
LC27	-	-	-	-	Normaali	Normaali	L858R (B)	Normaali
LC46	-	-	-	-	Normaali	Normaali	DEL 19	Normaali
LC52	-	X	X	-	Normaali	Normaali	Normaali	Normaali
LC73	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12ALA
LC75	X	-	X	-	Normaali	Normaali	L858R	Normaali
LC76	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12VAL
LC77	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12CYS
LC78	-	-	-	-	Normaali	Normaali	L861Q	Normaali
LC82	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12ASP
LC85	X	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12CYS
LC86	-	-	-	-	Normaali	Normaali	Normaali	12VAL

Molemmat potilaat, joilla todettiin EGFR-mutaation yhteydessä kopiomäärämuutos, olivat tupakoivia. Aikaisempien tutkimusten mukaan EGFR-mutaatio on yleisempi tupakoimattomilla naispuolisilla henkilöillä (Job ym. 2010; Weir ym. 2007: 433–438). Tutkimusaineistoon kuului sekä tupakoivia että tupakoimattomia EGFR-positiivisia potilaita, mutta otos oli liian pieni luotettavien johtopäätösten tekemiseen. Laajempaa vertailua tupakoinnin merkityksestä ei aineiston pienuuden vuoksi voida tehdä. Täydelliset tulokset kaikista potilasnäytteistä ovat liitteessä 4.

8 Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi

Laboratoriotyöskentelyn aikana käsiteltäessä DNA-materiaalia noudatettiin genetiikan laboratorion aseptisia työtapoja. DNA:n kontaminaatoriskiä pyrittiin pienentämään pitämällä kaikki putkien korkit ja pipetinkärkilaatikoiden kannet kiinni, huolehtimalla pintojen ja työvälineiden puhtaudesta sekä käyttämällä puuterittomia suojakäsineitä. Fluoresenssileimausaineiden valoherkkyys otettiin huomioon noudattamalla Agilentin aCGH-menetelmäohjeen suosituksia: vähentämällä DNA:n leimausvaiheessa valon määrää, käyttämällä valolta suojaavia eppendorffputkia sekä välttämällä näytteiden ylimääräistä pakastamista ja sulattamista. Entsyymien ennen aikainen aktivoituminen pyrittiin estämään säilyttämällä entsyymejä sisältävät reagenssit ja näytteet jäissä työskentelyn aikana.

Pipetointikäskalan vaikutusta kontrolloitiin jakamalla työt siten, että sama henkilö pipetoi aina koko pipetointisarjan. Työvaiheet suunniteltiin etukäteen ja niissä edettiin menetelmäohjeiden mukaisesti paitsi silloin, kun ohjeista poikkeaminen oli perusteltua. Kaikki työskentelyn aikana tapahtuneet poikkeamat kirjattiin ylös prosessin sujuvuuden varmistamiseksi. Inkubaatiot ja hybridisaatiot olivat kestoiltaan menetelmäohjeen mukaisia. Fragmentoitumisen tarkistukseen käytetyt Lonza FlashGel® -geelikasetit ja Loading Dye -väriaine olivat pakkauksen mukaan vanhentuneita, mutta tämä ei CMG-laboratorion aikaisemman kokemuksen perusteella vaikuttanut tuloksen luotettavuuteen.

Laboratorioprosessin luotettavuutta heikentää hieman se, ettei meillä ollut ennestään kokemusta aCGH:sta. Tämä johtui pääasiassa kustannussyistä. Tätä pyrittiin kompensoimaan tutustumalla työvaiheisiin teoriassa, mutta mahdollisia virhelähteitä oli varsinkin ensimmäisen näytesarjan kohdalla vaikeampi ennakoida. Tarkkaan laaditut tutkimuskysymykset varmistivat, että opinnäytetyön toteutus vastasi sille asetettuja tavoitteita.

Neljän potilasnäytteen hybridisaatio uusittiin, koska niiden QC-raporttien ja alustavan tarkastuksen perusteella ei voitu luotettavasti määritellä, ovatko CytoGenomics-ohjelman kopiomäärämuutoksiksi tulkitsemat löydökset todellisia muutoksia vai ohjelman virhetulkintoja. QC-raporttien perusteella näytteiden fluoresenssisigna-

lien intensiteetti ja taustakohinan määrä vaihtelee suuresti, mutta CytoGenomicsilla voidaan havaita, onko potilasnäytteen ja referenssi-DNA:n sitoutumisessa oligokoettiin on huomattava ero. Taustakohinasta huolimatta kopiomäärämuutoksia on havaittavissa jokaisella käytetyllä aCGH-mikrosirulla, mikä vahvistaa hybridisaation toimivuuden ja kyvyn osoittaa kopiomäärämuutoksia. Tulosten visualisointiin CytoGenomicsilla käytettiin Agilentin suosittamia asetuksia peräkkäisten koettimien määrästä ja log ratiosta; tällä tavoin rajattiin pois pienimmät kopiomäärämuutosalueet ja pienennettiin virheellisten tulkintojen riskiä. Professori Sakari Knuutila on lisäksi vahvistanut, että kaikki tässä opinnäytetyössä raportoidut muutosalueet sisältävät potentiaalisia kopiomäärämuutoksia ja avustanut virheellisten tulosten karsimisessa.

Progenetix-ohjelmalla tuotettu idiogrammi kaikkien kopiomäärämuutoksia sisältävien näytteiden yhteisistä muutosalueista vastaa lähes täydellisesti aiempien ohjelmalla analysoitujen aCGH-sarjojen tuloksia. Tämä puoltaa tulosten luotettavuutta, joten todelliseksi tulkitut poikkeavuudet ovat geenikopiomäärämuutoksesta johtuvia. FFPE-näytemateriaalin heikkolaatuisuus vähentää luotettavuutta, mutta tämä oli tiedossa ja heikon laadun vaikutukset tulivat odotetusti esiin. Erityisesti heikkolaatuisuus näkyi elektroforeesigeelillä, leimatun DNA:n alhaisena aktiivisuutena ja Cytogenomics-tuloksissa havaittavana taustakohinana. Näistä seikoista huolimatta kopiomäärämuutokset pystyttiin osoittamaan edellä mainituin tuloksin.

Patologi on antanut lausuntonsa kaikista tutkimukseen käytetyistä kudoksenäytteistä ja niiden kasvainkudoksen osuuden on varmistettu olevan yli 30 %. Näytteet ovat siis näiltä osin vertailukelpoisia. Yksi näyte jätettiin pois tutkimuksesta liian alhaisen tuumorikudospitoisuuden vuoksi.

CMG-laboratoriolla on voimassaoleva tutkimuslupa potilasmateriaalin ja kudoksenäytteiden käyttöön sekä eettiseltä toimikunnalta että Valviralta. Lupa kattaa myös tutkimusryhmässä tehtävät opinnäytetyöt, joten eettisyysongelmia ei ole. Tutkimusraportissa näytteistä käytetään LC-koodinumeroita, jotka ovat tutkimusryhmän omia tunnisteita eivätkä ole käytössä virallisissa dokumenteissa. Potilaita ja kudosplokkia ei voi siis jäljittää numeroinnin avulla virallisista järjestelmistä. Näytteiden karyotyyppien julkaisemisen luvallisuus on varmistettu.

9 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli osoittaa geenien kopiomäärämuutoksia array-CGH-menetelmällä. Aineistossa 20 näytteestä oli osoitettavissa yhteensä 166 geenien kopiomäärämuutosaluetta. Karyotyypiltään normaaleiksi luokiteltavia näytteitä oli kahdeksan. Tuumorikudoksen osuus oli näytteissä korkea, joten löydettyjen kopiomäärämuutosten suuri määrä vastasi odotuksia. Amplifikaatioiden osuus muutoksista oli 71,7 % ja yleisimmät amplifikaatioalueet olivat kromosomeissa 1q, 5p, 8q ja 14q. Deleetioalueista yleisimmät olivat kromosomeissa 6q ja 19p. Amplikoneja osoitettiin yksi, joka sijaitsi kromosomissa 17q12.

Saadut tulokset vastaavat osittain aikaisempaa keuhkosityövän tiimoilta saatua tutkimustietoa. Amplifikaatiovaltaisuus ja yleisimpien muutosalueiden sijainti vastaavat täysin NSCLC:lle tyypillistä kopiomäärämuutosjakaumaa, joten tämän perusteella tulokset ovat luotettavia. Aikaisemmissa tutkimuksissa potilasaineisto oli tästä työstä poiketen pääosin tupakoimatonta ja yhteen NSCLC:n alatyyppiin keskittyviä, joten tältä osin tämän työn tuloksia ei voi suoraan verrata aikaisempaan tietoon. Myös tutkimukseen valittujen neljän keuhkosityöpään liittyvän geenin mutaatioiden ja kopiomäärämuutosten yhteyttä tarkasteltiin.

Aineistosta osoitettiin kaksi näytettä, joissa EGFR-geenissä on L858R-mutaatio ja geenin alueella kopiomäärän amplifikaatio. Aikaisemman tutkimustiedon mukaan geenimutaation ja kopiomäärämuutoksen on todettu korreloivan keskenään erityisesti EGFR-geenin mutaation yhteydessä, joten tällaisen yhteneväisyyden löytyminen tässä työssä saaduista tuloksista oli odotettavissa. Kuudessa EGFR-positiivisessa näytteessä ei kuitenkaan tällaista yhteyttä kopiomäärämuutokseen havaittu. ALK-, BRAF- ja KRAS-geenien yhteyttä kopiomäärämuutokseen ei voitu osoittaa, mutta erittäin pienen otokoon vuoksi yhteyden mahdollisuutta ei voida kuitenkaan varmuudella poissulkea. BRAF-geenin kopiomäärämuutosten rinnalla esiintyi samalla potilaalla aina myös EGFR:n kopiomäärämuutos, tosin BRAF-positiivisia näytteitä oli vain kolme, joten tämän havainnon perusteella ei voida muodostaa luotettavia johtopäätöksiä kyseisten kopiomäärämuutosten yhteydestä.

Tämä opinnäytetyö on osa laajempaa tutkimusprojektia, jonka tarkoituksena on pyrkiä selvittämään kopiomäärämuutosten yhteyttä ei-pienisoluihin keuhkosityöpään. CMG-laboratorion tutkimuksen kokonaisvaltaisena tavoitteena on löytää uusia hoitomuotoja

NSCLC:hen sellaisille potilaille, joille olemassa olevat hoidot eivät tehoa. Tämän vuoksi erityisen mielenkiinnon kohteena ovat sellaiset geenialueet, joilta on löydettävissä hyvin vähän tai ei ollenkaan aikaisempaa tutkimustietoa kopiomäärämuutosten tai piste-mutaatioiden osalta. Tästä aineistosta ei tällaisia uusia alueita luotettavasti pystytty osoittamaan, mutta saadut tulokset tukivat jo olemassa olevaa tietoa tunnetuista NSCLC:hen liittyvistä kopiomäärämuutosalueista. Tämän työn jälkeen projekti tulee todennäköisesti jatkumaan tutkimuksilla, joilla pyritään löytämään biomarkkereita, joihin hoito voidaan kohdistaa.

Opinnäytetyön yhtenä tavoitteena oli rajata aCGH:lla osoitetuista kopiomäärämuutoksista jatkotutkimuksen kannalta mielenkiintoisimmat alueet. Tutkimusryhmän seuraavana etappina on etsiä määritetyiltä pienimmiltä yhteisiltä alueilta ne geenit, joihin kopiomäärämuutos kohdistuu. Tutkimukseen kuuluvan neljän onkogeenin mutaation lisäksi sekvensoinnilla on osoitettu kymmeniä muita geenimutaatioita, joiden yhteys kopiomäärämuutokseen on myös syytä selvittää. Jatkossa kopiomäärämuutoskohtien läpikäyminen esimerkiksi FISH-tutkimuksen avulla voisi myös tuoda lisätietoa aiheesta. Erityisesti hyödyllistä olisi tarkemmin tutkia kromosomissa 17q12 sijaitseva amplikon ja kartoittaa, mitä geenejä sen alueella sijaitsee ja mitkä näistä ovat drivergeenejä. Mikäli kopiomäärämuutoksen kohde- tai drivergeenit pystytään tunnistamaan ja niiden yhteys NSCLC:hen on todistettavissa, voidaan geenitietoja hyödyntää biomarkkerina täsmälääkkeiden kehittämisessä.

Array-CGH:lla saatiin tuotua esiin yleisimmät muutosalueet, joiden lähempi tarkastelu on otoskoon pienuudesta huolimatta mahdollista. Array-CGH-menetelmän etuna on, että sen avulla voidaan yhdellä kertaa kartoittaa kopiomäärämuutoksia koko genomin laajuisesti. Kohdistettu sekvensointi ja FISH-menetelmä ovat hyviä jatkotutkimusmenetelmiä, koska aCGH-tulosten perusteella tutkimus voidaan kohdistaa spesifiin geeniin tai sen osaan. Tutkimuksen laajentaminen epigenetiikan puolelle ei myöskään ole poissuljettua, sillä delettioiden metyloituneiden alueiden määrittäminen voi tuoda lisää informaatiota ja tuoreita näkökulmia syöpägenetiikkaan.

Tulosten arvioinnissa potilaiden kliiniset esitiedot merkitsevät paljon ja tämä olisi ollut hyvä sisäistää jo suunnitelmavaiheessa. Käytetty näytemateriaali oli keuhkosyöpätyypin, tupakointistatuksen ja geenimutaatiostatuksen suhteen hyvin vaihtelevaa ja otoskoko pieni, jotta tulosten perusteella voitaisiin muodostaa täysin luotettavia johtopäätöksiä. Havaitut kopiomäärämuutosalueet olivat kuitenkin suurimmaksi osaksi yh-

teneväisiä aiemman tutkimustiedon kanssa. Riippuvuussuhteita kliinisten esitietojen, geenimutaatioiden ja kopiomäärämuutosten välillä voitaisiin jatkossa laskea käyttämällä apuna tilastollisia menetelmiä, esimerkiksi Pearsonin korrelaatiokerrointa. Tämä ei kuitenkaan ollut tässä työssä mahdollista, sillä aineiston vaihtelevuuden vuoksi tilastollisen analyysin tulokset eivät olisi olleet luotettavia. FFPE-näytemateriaalin heikkous oli jo tiedossa, kuten myös sen asettamat haasteet analyysi- ja tulosten tulkintavaiheessa, mutta se ei loppujen lopuksi vaikuttanut tulosten luotettavuuteen huomattavasti.

CMG-laboratorion voimassaoleva tutkimuslupa sekä eettisen toimikunnan lupa kattavat kudoksenäytteiden käytön tutkimuksessamme. Periaatteena oli potilaiden tunnistetietojen pitäminen vain asianomaisten tiedossa, minkä vuoksi näytteiden tunnistamiseen käytettiin tutkimusryhmän omia tunnistenumeroita, jotka ovat jäljitettävissä ainoastaan CMG-laboratorion omista tietokannoista. Eettisyyden kannalta ongelmia ei siis ole. Työprosessin ja tulosten luotettavuutta on pohdittu tarkemmin kappaleessa 8.

Opinnäytetyöprosessi antoi mahdollisuuden toimia osana kansainvälistä tutkimusryhmää ja harjoittaa ammatillisen englanninkielen taitoja. Englanninkieliset työohjeet ja lähdemateriaali olivat suureksi hyödyksi ammatillisen sanavaraston laajentamisessa. Teoriatietoa läpikäydessä lähdemateriaalia opittiin etsimään ja tutkimaan kriittisesti, mutta silti monipuolisesti. Molekyylikaryotyypitys ja syöpägenetiikka ovat aiheina hyvin laajoja, joten aiheen rajaaminen opinnäytetyön puitteisiin sopivaksi asetti aluksi haasteita. Kuitenkin tässä työssä käsitelty kokonaisuus oli ammatillisesti kehittävä ja työssä onnistuttiin tuottamaan materiaalia, jota tutkimusryhmä voi jatkossa käyttää. Professori Sakari Knuutilan laajaa sytomolekyyli-genetiikan kokemusta ja asiantuntemusta hyödynnettiin työn puitteissa ja samalla syventyi oma genetiikan alan osaaminen. Koko aCGH-prosessi opittiin suorittamaan aina näytemateriaalin keräämisestä tulosten tulkintaan asti ja samalla saatiin kokemusta tutkimuslaboratorion työtavoista ja tutkimusryhmän käytännön työstä. Opinnäytetyöprosessi oli oppimiskokemuksena antoisa ja käytännössä päästiin hyödyntämään koko koulutuksen aikana hankittua tietoa ja taitoa.

Lähteet

Agilent Technologies 2012. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic labeling for blood, cells, or tissue (with a High Throughput option). Menetelmäohjeet. Versio 7.2, 2012. Verkkodokumentti. <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4410-90010_CGH_Enzymatic_Protocol_7.2.pdf>. Luettu 7.1.2013.

Aittomäki, Kristiina – Peltomäki, Päivi 2006. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim. 186–204.

Amin, H.M. – Lai, R. 2007. Pathobiology of ALK⁺ anaplastic large-cell lymphoma. Blood. 2007;110. 2259 – 2267.

Baudis, M. 2012a. arrayMap: Genomic arrays for copy number profiling in human cancer. Verkkotietokanta. Päivitetty 1.3.2013. <http://www.arraymap.org/cgi-bin/subsetIndex.cgi?subsetType=ICDM&ICDMcodes_m=8046/3&project=arraymap&Qcvt=1>. Luettu 6.3.2013.

Baudis, M. 2012b. Progenetix oncogenomic online resource. Verkkotietokanta. Päivitetty 1.3.2013. <<http://progenetix.org/>>. Luettu 6.3.2013.

Baudis, M. – Cleary, M. L. 2001. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. Bioinformatics, 17(12), 1228–1229.

Brose, Marcia S. – Volpe, Patricia – Feldman, Michael – Kumar, Madhu – Rishi, Irum – Guerrero, Renee – Einhorn, Eugene – Herlyn, Meenhard – Minna, John – Nicholson, Andrew – Roth, Jack A. – Albelda, Steven M. – Davies, Helen – Cox, Charles – Brignell, Graham – Stephens, Philip – Futreal, P. Andrew – Wooster, Richard – Stratton, Michael R. – Weber, Barbara L. 2002. BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. Cancer Research 62. 6997–7000.

Cai, H. – Kumar, N. – Baudis, M. 2012. arrayMap: A Reference Resource for Genomic Copy Number Imbalances in Human Malignancies. PLoS Medicine One 7 (5).

De Witte, Anniek – Lea-Chou, Elaine – Collins, Jim 2007. Copy Number Analysis of Archival FFPE Tumor Samples by Oligo Array CGH. Verkkodokumentti. <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-7120EN.pdf>>. Luettu 5.3.2013.

Genetics Home Reference 2013. Handbook – Help Me Understand Genetics. Verkkojulkaisu. Päivitetty 18.3.2013. <<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook.pdf>>. Luettu 19.3.2013.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2009. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOYpro. 317–330.

Human Genome Organisation 2013. Verkkodokumentti. <<http://www.hugo-international.org>>. Luettu 10.1.2013.

Huuskonen, Matti S. – Jahkola, Antti – Oksa, Panu 2010. Asbestisairaudet. Lääkärin käsikirja. Verkkodokumentti.
<http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt00186>. Luettu 1.10.2012.

Inoue, A. – Nukiwa, T. 2005. Gene Mutations in Lung Cancer: Promising Predictive Factors for the Success of Molecular Therapy.
<<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0020013#>>. Verkkodokumentti. Luettu 1.10.2012.

Isola, Jorma 2007. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit. Helsinki: Duodecim. 16–33.

Job, Bastien – Bernheim, Alain – Beau-Faller, Michèle – Camilleri-Broët, Sophie – Girard, Philippe – Hofman, Paul – Mazières, Julien – Toujani, Saloua – Lacroix, Ludovic – Laffaire, Julien – Dessen, Philippe – Fouret, Pierre 2010. Genomic Aberrations in Lung Adenocarcinoma in Never Smokers. PLoS One 5 (12).

Kalari, Krishna R. – Rossell, David – Necela, Brian M. – Asmann, Yan W. – Asha Nair – Baheti, Saurabh – Kachergus, Jennifer M. – Younkin, Curtis S. – Baker, Tiffany – Carr, Jennifer M. – Tang, Xiaojia – Walsh, Michael P. – Chai, High-Seng – Sun, Zhifu – Hart, Steven N. – Leontovich, Alexey A. – Hossain, Asif – Kocher, Jean-Pierre – Perez, Edith A. – Reisman, David N. – Fields, Alan P. – Thompson, E. Aubrey 2012. Deep Sequence Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer: Integrated Analysis of Gene Expression, Alternative Splicing, and Single Nucleotide Variations in Lung Adenocarcinomas with and without Oncogenic KRAS Mutations. Frontiers in Oncology 2 (12).

Kallioniemi, Olli – Pitkänen, Kimmo – Knowles, Jonathan 2010. Molekyyilitason näkökulma potilaan hoitoon. Verkkodokumentti.
<<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo99116.pdf>>. Luettu 3.10.2012.

Knuutila, Sakari 2000. Sytogenetiikka ja molekyylipatologia syöpätautien diagnostiikassa – esimerkkeinä lymfoomat ja sarkoomat. Verkkodokumentti.
<http://www.helsinki.fi/cmg/dokumentit/SLL_1831.pdf>. Luettu 17.9.2012.

Knuutila, Sakari 2006. Geenit kromosomeissa: sytogenetiikan perusteet. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim. 31–47.

Knuutila, Sakari 2012a. Professori. Suullinen tiedonanto. Sytomolekyyliigenetiikan laboratorio. 4.9.2012.

Knuutila, Sakari 2012b. DNA-sirumenetelmät. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 1190–1191.

Knuutila, Sakari 2013. Professori. Suullinen tiedonanto. Sytomolekyyliigenetiikan laboratorio. 5.3.2013.

Knuutila, Sakari – Wirtanen, Tiina 2012. Asiantuntija. Suullinen tiedonanto. Sytomolekyyliigenetiikan laboratorio. 31.10.2012.

Knuuttila, Aija 2011. Keuhkosityöpä. Lääkärin käsikirja.
<http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=ykt00184>. Verkkodokumentti.
Luettu 1.10.2012.

Koivunen, Jussi P. – Mermel, Craig – Zejnullahu, Kreshnik – Murphy, Carly – Lifshits, Eugene – Holmes, Alison J. – Choi, Hwan Geun – Kim, Jhingook – Chiang, Derek – Thomas, Roman – Lee, Jinseon – Richards, William G. – Sugarbaker, David J. – Ducko, Christopher – Lindeman, Neal – Marcoux, J. Paul – Engelman, Jeffrey A. – Gray, Nathanael S. – Lee, Charles – Meyerson, Matthew – Jänne, Pasi A. 2008. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 14 (13). 4275–4283.

Käypä Hoito 2008. Keuhkosityöpä. Hoitosuosituksset. Verkkodokumentti.
<<http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi06050.pdf>>. Luettu 17.9.2012.

Käypä Hoito -suosituksen päivitystiivistelmä 2009. Keuhkosityövän Hoito.
Verkkodokumentti. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo97831.pdf>>. Luettu 3.10.2012.

Ladanyi, Marc – Pao, William 2008. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Modern Pathology* 21 (S2). 16–22.

Lehto, Veli-Pekka – Stenbäck, Frej 2012a. Normaali solu: proto-onkogeeneit ja onkogeeneit. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): *Patologia*. Helsinki: Duodecim. 251–254.

Lehto, Veli-Pekka – Stenbäck, Frej 2012b. Syövän avaingeeneit: onkogeeneit ja kasvunrajoitegeeneit. Teoksessa Mäkinen, Markus – Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen, Timo – Stenbäck, Frej (toim.): *Patologia*. Helsinki: Duodecim. 250–251.

Lonza 2009. Lonza FlashGel® System. Menetelmäohje. Verkkodokumentti.
<http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_FlashGel_System_-_Protocol.pdf>. Luettu 7.3.2013.

Lovly, Christine – Horn, Leora – Pao, William 2012a. My Cancer Genome: KRAS c.35G>C (G12A) Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer. Verkkodokumentti.

Lovly, Christine – Horn, Leora – Pao, William 2012b. My Cancer Genome: What is BRAF? Verkkodokumentti. <<http://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/braf>>. Luettu 19.3.2013.

Lovly, Christine – Horn, Leora – Pao, William 2012c. My Cancer Genome: What is Kras? Verkkodokumentti. <<http://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/kras>>. Luettu 11.3.2013.

Mali, Pekka – Ojala, Antti – Salo, Jarmo A. 2006. Keuhkosityöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 277–294.

Myllykangas, S. – Böhlting, T. – Knuuttila, S. 2007. Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 17 (1). 45–55.

National Cancer Institute 2012. Drugs Approved for Lung Cancer. Verkkodokumentti. <<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/lungcancer#dal1>>. Luettu 24.3.2013.

OMIM 2013. Online Mendelian Inheritance in Man. Verkkotietokanta. Päivitetty 19.3.2013. <<http://www.omim.org/>>. Luettu 6.3.2013.

Paik, PK – Arcila, ME – Fara, M – Sima, CS – Miller, VA – Kris, MG – Ladanyi, M – Riely, GJ 2011. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology* 29 (15). 2046–2051.

Pao, William – Miller, Vincent – Zakowski, Maureen – Doherty, Jennifer – Politi, Katerina – Sarkaria, Inderpal – Singh, Bhuvanesh – Heelan, Robert – Rusch, Valerie – Fulton, Lucinda – Mardis, Elaine – Kupfer, Doris – Wilson, Richard – Kris, Mark – Varmus, Harold 2004. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *PNAS* 101 (36). 13306–13311.

Pikor, Larissa A. – Enfield, Katey S. S. – Cameron, Henryet – Lam, Wan L. 2011. DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses. *Journal of Visualized Experiments* 49. 2763.

Ribas, Antoni – Flaherty, Keith T. 2011. BRAF targeted therapy changes the treatment paradigm in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8. 426–433.

Riely, Gregory J. – Kris, Mark G. – Rosenbaum, Daniel – Marks, Jenifer – Li, Allan – Chitale, Dhananjay A. – Nafa, Kheudoudja – Riedel, Elyn R. – Hsu, Meier – Pao, William – Miller, Vincent A. – Ladanyi, Marc 2008. Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 14 (18). 5731–5734.

Riely, Gregory J. – Ladanyi, Marc 2008. KRAS Mutations: An Old Oncogene Becomes a New Predictive Biomarker. *The Journal of Molecular Diagnostics* 10 (6). 493–495.

Shaffer, Lisa G. – Slovak, Marilyn L. – Campbell, Lynda J. 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger. 121–128.

Shaw, AT. – Yeap, BY. – Mino-Kenudson, M. – Digumarthy, SR. – Costa, DB. – Heist, RS. – Solomon, B. – Stubbs, H. – Admane, S. – McDermott, U. – Settleman, J. – Kobayashi, S. – Mark, EJ. – Rodig, SJ. – Chirieac, LR. – Kwak, EL. – Lynch, TJ. – Iafrate, AJ. 2009. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology* 27 (26). 4247–4253.

Suomen syöpärekisteri 2012a. Yleisimmät syöpäkuolemansyyt vuonna 2010, miehet. Verkkodokumentti. <<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0020m0.html>>. Luettu 1.10.2012.

Suomen syöpärekisteri 2012b. Yleisimmät syöpäkuolemansyyt vuonna 2010, naiset. Verkkodokumentti. <<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0021m0.html>>. Luettu 1.10.2012.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani (toim.) 2010. Geeniteknikassa käytettävät entsyymit. Turun Ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu. 112–210.

Thomas, Roman K. – Weir, Barbara – Meyerson, Matthew 2006. Genomic approaches to lung cancer. *Clinical Cancer Research* 12. 4384–4391.

Thu, Kelsie L. – Vucic, Emily A. – Chari, Raj – Zhang, Wei – Lockwood, William W. – English, John C. – Fu, Rong – Wang, Pei – Feng, Ziding – MacAulay, Calum E. – Gazdar, Adi F. – Lam, Stephen – Lam, Wan L. 2012. Lung Adenocarcinoma of Never Smokers and Smokers Harbor Differential Regions of Genetic Alteration and Exhibit Different Levels of Genomic Instability. *PLoS One* 7 (3).

Tyybäkinoja, A. – Knuutila, S. 2006. Molekyylikärytyypitys – raja sytogenetiikan ja molekyylibiologian väliltä häviämässä. Verkkodokumentti.
<<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo95940.pdf>>. Luettu 17.9.2012.

Weir, Barbara – Meyerson, Matthew – Zhao, Xiaojun 2004. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell* (6) 5. 433–438.

Weir, Barbara A. – Woo, Michele – Getz, Gad – Perner, Sven – Ding, Li – Beroukhi, Rameen – Lin, William M. – Province, Michael A. – Kraja, Aldi – Johnson, Laura A. – Shah, Kinjal – Sato, Mitsuo – Thomas, Roman K. – Barletta, Justine A. – Borecki, Ingrid B. – Broderick, Stephen – Chang, Andrew C. – Chiang, Derek Y. – Chirieac, Lucian R. – Cho, Jeonghee – Fujii, Yoshitaka – Gazdar, Adi F. – Giordano, Thomas – Greulich, Heidi – Hanna, Megan – Johnson, Bruce E. – Kris, Mark G. – Lash, Alex – Lin, Ling – Lindeman, Neal – Mardis, Elaine R. – McPherson, John D. – Minna, John D. – Morgan, Margaret B. – Nadel, Mark – Orringer, Mark B. – Osborne, John R. – Ozenberger, Brad – Ramos, Alex H. – Robinson, James – Roth, Jack A. – Rusch, Valerie – Sasaki, Hidefumi – Shepherd, Frances – Sougnez, Carrie – Spitz, Margaret R. – Tsao, Ming-Sound – Twomey, David – Verhaak, Roel G. W. – Weinstock, George M. – Wheeler, David A. – Winckler, Wendy – Yoshizawa, Akihiko – Yu, Soyoung – Zakowski, Maureen F. – Zhang, Qunyan – Beer, David G. – Wistuba, Ignacio I. – Watson, Mark A. – Garraway, Levi A. – Ladanyi, Marc – Travis, William D. – Pao, William – Rubin, Mark A. – Gabriel, Stacey B. – Gibbs, Richard A. – Varmus, Harold E. – Wilson, Richard K. – Lander, Eric S. – Meyerson, Matthew 2007. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450. 893–898.

Zhang, Nancy R. 2010. DNA Copy Number Profiling in Normal and Tumor Genomes. Teoksessa Feng, Jianfeng – Fu, Wenjiang – Sun, Fengzhu (toim.): *Frontiers in Computational and Systems Biology*. Lontoo: Springer London. 259–281.

Laboratoriopäiväkirja

Laboratoriopäiväkirjassa on kuvattu aCGH-analyysiprosessin vaiheet ensimmäisen näytesarjan osalta. Sarjassa on 8 potilasnäytettä ja 8 referenssi-DNA-näytettä. Kaikkien näytesarjojen osalta työskentely tapahtui Agilentin array-CGH-menetelmäohjeen sekä Lonzan FlashGel® System -menetelmäohjeen mukaisesti. Muutamassa kohdassa on poikettu menetelmäohjeesta, esimerkiksi suurentamalla pipetointimäärää tai pidentämällä sentrifugointiaikaa. Näistä poikkeamista on maininta laboratoriopäiväkirjassa. Näytesarjojen 2–4 työvaiheet on suoritettu tässä laboratoriopäiväkirjassa kuvattua prosessia noudattaen, seuraavia poikkeuksia lukuunottamatta:

- Näytesarjat 2 ja 3 on prosessoitu leimausaktiivisuuden mittausvaiheeseen saakka samanaikaisesti.
- Näyte LC23 on prosessoitu erikseen sarjaan 3 näytteen LC71 poisjäännin takia.
- Näytteen LC24 olemme itse eristäneet parafiiniin valetusta kudosplokista, Qia-
genin QIAamp® DNA Mini Kit (LOT 142341149) -menetelmällä reagenssipak-
kauksen ohjeen mukaisesti.

Esivalmistelut

- Kaikkien näytteiden DNA:n konsentraatio ja puhtauden mittaus NanoDrop ND-1000 -laitteella
- Kaikkien näytteiden DNA:n fragmentoitumisen tarkistus Lonza FlashGel® -elektroforeesigeelillä
- Käytetyt geelikasetit ja reagenssit:
 - Lonza FlashGel® DNA Cassette 1,2% Agarose, 16+1 well double-tier, LOT 0000291437, exp 24.8.2012
 - Lonza FlashGel® DNA Cassette 1,2% Agarose, 12+1 well single-tier, LOT 0000189183, exp 16.12.2010
 - Lonza FlashGel® Loading Dye 5x concentration, LOT 0000132372, exp 30.6.2010
 - Lonza FlashGel® DNA Marker, LOT 02-09-11, avattu 20.3.2012

Päivä 1 – Digestio

- Referenssi-DNA-näytteiden valmistus: sarjan jokaista potilasnäytettä kohti valmistettiin samaa sukupuolta edustava referenssi-DNA, käytössä seuraavat
- Käytetyt referenssi-DNA-valmisteet:
 - Human Reference DNA Female, valmistaja Agilent, LOT 0006139260
 - Human Reference DNA Male, valmistaja Agilent, LOT 0006139685

- Potilas- ja referenssinäytteiden laimennos vakioilavuuteen (10,1 µl) siten, että saanto on 500 ng
- Pipetointimäärien laskukaavat:
 - $a) \text{DNA:n määrä (}\mu\text{l)} = 500 \div \text{DNA:n konsentraatio (ng/}\mu\text{l)}$
 - $b) \text{Nukleaasivapaan veden määrä (}\mu\text{l)} = 10,1\mu\text{l} - \text{DNA:n määrä (}\mu\text{l)}$
- Digestio Master Mixin valmistus (16x)
- Käytetty SureTag® DNA Labeling Kit -pakkauksen reagensseja:
 - Agilent SureTag® DNA Labeling Kit -20 °C Box. Sarjat 1 & 2: LOT 0006100114, avattu 29.5.2012. Sarjat 3 & 4: LOT 0006155891, avattu 21.1.2013
- Digestio Master Mixin lisäys näyteputkiin 2,9 µl
- Inkubointi 37 °C:n vesihauteella 2 tuntia ja 65 °C:n lämpölevyllä 20 minuuttia
- DNA:n fragmentoitumisen tarkistus Lonza FlashGel® -elektroforeesigeelillä
- Näytteiden säilytys pakastettuna -20 °C:ssa

Päivä 2 – Fluoresenssileimaus

- Random primerin lisäys näyteputkiin 2,5 µl
- Inkubointi 95 °C:n lämpölevyllä 3 minuuttia
- Jäähdytys jäällä 5 minuuttia
- Labeling Master Mixien valmistus, potilasnäytteille Cy-5 ja referensseille Cy-3 (16x), käytettiin SureTag® DNA Labeling Kit -pakkauksen reagensseja
- Labeling Master Mixin lisäys näyteputkiin 11,5 µl
- Inkubointi 37 °C:n vesihauteella 2 tuntia ja 65 °C:n lämpölevyllä 10 minuuttia
- Näytteiden säilytys pakastettuna -20 °C:ssa

Päivä 3 – Puhdistus ja hybridisaatioparien valinta

- DNA:n puhdistus yksinkertaisella TE-pesupuskurilla sentrifugoiden näytettä pesupylväessä, suoritettiin Agilentin menetelmäohjeen mukaisesti
- Ohjeesta poiketen yksinkertaisen TE-pesupuskurin toisen lisäyksen (480 µl) jälkeen sentrifugointiaikaa pidennetty 19 minuuttiin
- Käytetyt reagenssit ja tarvikkeet:
 - 1xTE, pH 8.0, valmistettu 13.12.2012 ja 9.1.2013
 - Microcon Ultracel YM-30 -pylväs, LOT R9AN68482
- DNA:n määrän mittaaminen, lisäsentrifugointeja sen ylittäessä 9,5 µl
- Leimausaktiivisuuden mittaaminen NanoDrop ND-1000 -laitteella
- Leimautumisasteen, aktiivisuuden ja saannon laskukaavat:
 - $a) \text{Leimautumisaste (\%)} = \frac{340 \times \text{Cy3 tai Cy5 absorbanssi (pmol/}\mu\text{l)}}{\text{DNA:n konsentraatio (ng/}\mu\text{l)} \times 1000} \times 100\%$
 - $b) \text{Aktiivisuus (pmol/}\mu\text{g)} = \text{Leimautumisaste} \div 0,034$
 - $c) \text{Saanto (}\mu\text{g)} = \frac{\text{DNA:n konsentraatio (ng/}\mu\text{l)} \times \text{näytteen määrä (}\mu\text{l)}}{1000 \text{ ng/}\mu\text{g}}$

- Hybridisaatioparien valinta ja referenssi-DNA-putken yhdistäminen sitä vastaavaan potilasnäyteputkeen
- Yhdistetyn putken sisällön määrän mittaaminen ja tarvittaessa yksinkertaisen TE:n lisäys 16 µl:aan saakka
- Näytteiden säilytys pakastettuna -20 °C:ssa
- Agilentin 10x aCGH Blocking Agentin valmistus Oligo aCGH Hybridization Kit -pakkauksen ohjeen mukaisesti

Päivä 4 – Hybridisaatio

- Hybridisaatio Master Mixin valmistus (8x), reagenssien määriä lisättiin reaktiota kohden 5 µl ylimääräistä
- Käytetyt reagenssit:
 - Agilent 2x Hi-RPM Hybridization Buffer, LOT 0006081998, avattu 21.5.2012
 - Agilent 10x aCGH Blocking Agent, LOT 0006125351, valmistettu 9.1.2013
 - Human Cot-1 DNA®, valmistaja Invitrogen, LOT 858992
- Hybridisaatio Master Mixin lisäys näyteputkiin 34 µl
- Inkubointi 95 °C:n lämpölevyllä 3 minuuttia ja 37 °C:n vesihauteella 30 minuuttia
- Näytteen pipetointi mikrosirulle, menetelmäohjeesta poiketen nostimme näytteen määrää 45 µl:aan
- Käytetyt mikrosirut:
 - Agilent G4450A SurePrint G3 Human CGH 8x60K Oligo Microarray Kit, LOT 0006107221-P10036, avattu 26.10.2011, exp 31.7.2013 ja LOT 0006144459-P10051, avattu 28.1.2013, exp 30.9.2014
- Hybridisaatio 65 °C:n hybridisaatiouunissa 20 rpm:n kierrosnopeudella 24 tunnin ajan

Päivä 5 – Pesu ja skannaus

- Pesu A, suoritus Agilentin menetelmäohjeen mukaisesti
- Pesupuskureiden valmistukseen käytetyt reagenssit:
 - 20xSSPE, LOT 0810-4L, valmistettu 23.6.2010, pitoisuuksilla 0,5xSSPE (Wash Buffer 1) ja 0,1xSSPE (Wash Buffer 2)
 - 20% N-lauroylsarcosine, LOT 048K6152, avattu 20.10.2009
 - Tislattu vesi (MilliQ)
- Mikrosirun skannaus Agilent SureScan DNA Microarray Scanner -laitteella
- Agilent Scan Control -ohjelman asetukset ja työskentely Agilentin menetelmäohjeen mukaisesti
- Skannatun kuvatiedoston muuttaminen tekstitiedostoksi Agilent Feature Extraction -ohjelmalla ja tulosten vienti Agilent CytoGenomics -ohjelmaan

Tulosten analysointi

- Kopiomäärämuutosalueiden tarkistus, rajaaminen ja analysointi Agilent CytoGenomics -ohjelmalla (versio 2.0)
- Kopiomäärämuutosalueiden toistuvuuden ja yhteisten kromosomialueiden analysointi Progenetix -ohjelmalla.

NanoDrop-mittaustulokset

Potilasnäytteiden DNA-pitoisuudet, fluoresenssileiman absorbanssi, leimautumisaktiivisuus, leimautumisaste ja saanto.

Näyte	Mitattu	Eristetyn DNA:n konsentraatio (ng/μl)	Cy-5 absorbanssi (pmol/μl)	Leimatun DNA:n konsentraatio (ng/μl)	Leimautumisaste (%)	Aktiivisuus	Saanto (μg)
LC1	7.1.2013	192,70	12,97	442,40	1,00	29,32	4,2
LC2	7.1.2013	53,72	7,47	364,79	0,70	20,48	3,5
LC5	7.1.2013	29,72	3,86	270,48	0,49	14,27	2,6
LC7	7.1.2013	764,29	10,1	445,09	0,77	22,69	4,2
LC9	7.1.2013	547,41	4,95	325,44	0,52	15,21	3,1
LC10	7.1.2013	87,41	3,36	112,77	1,01	29,80	1,1
LC11	7.1.2013	28,11	1,7	86,96	0,66	19,55	0,8
LC12	7.1.2013	145,84	4,08	192,99	0,72	21,14	1,8
LC23	7.1.2013	49,34	8,71	375,86	0,79	23,17	3,6
LC24	7.1.2013	71,26	2,52	91,01	0,94	27,69	0,9
LC27	7.1.2013	389,51	4,73	328,05	0,49	14,42	3,1
LC46	7.1.2013	231,39	4,48	298,11	0,51	15,03	2,8
LC52	7.1.2013	416,02	5,27	404,60	0,44	13,03	3,8
LC55	7.1.2013	122,50	4,74	424,08	0,38	11,18	4,0
LC73	7.1.2013	401,49	4,17	209,53	0,68	19,90	2,0
LC75	7.1.2013	115,90	3,3	303,52	0,37	10,87	2,9
LC76	7.1.2013	168,96	3,38	167,17	0,69	20,22	1,6
LC77	7.1.2013	338,47	3,81	406,33	0,32	9,38	3,9
LC78	7.1.2013	434,14	8,77	595,67	0,50	14,72	5,7
LC79	7.1.2013	455,11	3,52	259,21	0,46	13,58	2,5
LC80	7.1.2013	161,41	3,17	184,93	0,58	17,14	1,8
LC81	7.1.2013	133,04	17,51	592,66	1,00	29,54	5,6
LC82	7.1.2013	211,16	2,41	191,48	0,43	12,59	1,8
LC83	7.1.2013	426,95	4,52	272,95	0,56	16,56	2,6
LC84	7.1.2013	356,94	3,78	271,84	0,47	13,91	2,6
LC85	7.1.2013	389,38	6,32	378,12	0,57	16,71	3,6
LC86	7.1.2013	507,80	3,41	155,11	0,75	21,98	1,5
LC87	7.1.2013	399,40	6,81	331,13	0,70	20,57	3,1

Mikrosirujen pipetointikaaviot: näytesarjat ja hybridisaatioparit

	Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC81	LC55	LC78	LC77
	male 1	male 2	female 1	female 2
	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC85	LC75	LC52	LC76
	female 3	female 4	female 5	female 6
				UUSITTU

Array 2_1

Array 2_2

Array 2_3

Array 2_4

Barcode Number 252192415437 hybridisaatio 10.1.2013 klo 09:25

	Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC87	LC73	LC7	LC12
	male 1	male 2	male 3	female 1
	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC10	LC83	LC82	LC1
	female 2	female 3	female 4	female 5
	UUSITTU			

Array 2_1

Array 2_2

Array 2_3

Array 2_4

Barcode Number 252192418785 hybridisaatio 28.1.2013 klo 08:50

	Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC86	LC80	LC46	LC79
	male 1	male 2	male 3	female 1
	UUSITTU	UUSITTU		
	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC23	LC84	LC27	LC9
	female 2	female 3	female 4	female 5
	Array 2_1	Array 2_2	Array 2_3	Array 2_4
Barcode Number 252192418869 hybridisaatio 30.1.2013 klo 09:35				

	Array 1_1	Array 1_2	Array 1_3	Array 1_4
B A R C O D E	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC11	LC2	LC86	LC80
	male 1	male 2	male 3	male 4
	Sample:	Sample:	Sample:	Sample:
	LC5	LC76	LC24	LC10
	female 1	female 2	female 3	female 4
	Array 2_1	Array 2_2	Array 2_3	Array 2_4
Barcode Number 252192418870 hybridisaatio 13.2.2013 klo 09:11				

Potilasnäytteiden karyotyypit

Potilasnäytteet, jotka osoitettiin karyotyypiltään normaaliksi. Yhteensä 8 näytettä.

Näyte	Sukupuoli	Karyotyyppi
LC9	nainen	arr(1-22,X)×2
LC11	mies	arr(1-22)×2,(XY)×1
LC23	nainen	arr(1-22,X)×2
LC55	mies	arr(1-22)×2,(XY)×1
LC76	nainen	arr(1-22,X)×2
LC77	nainen	arr(1-22,X)×2
LC78	nainen	arr(1-22,X)×2
LC87	mies	arr(1-22)×2,(XY)×1

Potilasnäytteet, joista osoitettiin kopiomäärämuutoksia. Yhteensä 20 näytettä.

Näyte	Sukupuoli	Deleetiot (×1)	Amplifikaatiot (×3)
LC1	nainen		1qter(145,515,383-249,212,668) 7pter(92,532-57,494,441) 7qter(62,516,153-159,088,577)
LC2	mies		12pter(230,421-33,190,977)
LC5	nainen	2pterp24.2(42,444-17,274,850) 4pterp15.33(71,552-1,395,0562) 4q21.1q28.1(76,521,417-127,453,191) 9pterp23(271,257-10,554,090) 18q12.1q23(27,095,755-77,982,126)	1p31.3p21.1(67,816,733-106,341,021) 1qter(144,988,715-249,212,609) 3q22.1qter(130,893,897-197,840,339) 6p21.1p12.3(41,873,240-47,632,977) 7p15.3p14.1(24,126,329-40,380,042) 7p14.1p11.2(43,139,655-56,643,855) 8p23.1p11.1(9,578,275-43,333,638) 8qter(47,868,796-146,279,961) 9p21.1p13.1(30,810,232-39,156,954) 11p15.3p15.2(12,229,467-14,157,140) 12pter(230,421-33,454,095) 12qter(38,572,677-133,819,033) 13q31.3q32.3(94,993,996-99,446,282) 16qter(46,726,341-90,111,263) 17p13.1p11.2(9,281,920-20,912,639) 17q12q21.31(38,008,326-41,659,047) 18pter(2,595,400-14,766,161) 19q11q13.2(28,272,497-43,077,841) 19q13.42qter(54,195,499-59,092,515) 22q11.1q12.3(17,280,847-32,644,810) Xp11.3p11.22(45,856,483-51,151,319)

LC7	mies		8q12.3qter(63,892,527-146,280,020) 12q13.3q21.1(57,682,667-71,526,560) 13q32.1q33.1(95,813,476-102,108,845) 14q11.2q23.3(21,093,188-65,176,689)
LC10	nainen	9p24.3p21.1(730,034-31,642,059) 18q11.2qter(21,745,057-77,982,126)	8q22.1q23.1(94,550,070-107,764,059)
LC12	nainen	19pter(327,273-23,911,266) 20q11.21q13.32(29,888,477-56,798,215)	2pter(42,444-89,508,067) 8pter(221,611-43,333,638) 8qter(47,868,796-146,280,020) 10pterp11.1(148,206-38,295,993) 10q23.2q26.3(88,232,111-131,643,607) 12pter(230,421-33,039,420) 14q11.2q13.3(23,138,372-37,020,815) 20pter(121,521-25,663,675) 20q13.32qter(56,859,986-62,893,189)
LC24	nainen		1pter(759,762-118,168,804) 1qter(144,988,715-249,212,668) 4p15.33p11(14,454,449-48,863,090) 4qter(53,377,684-190,896,615) 5pter(151,737-46,100,367) 5qter(49,690,172-180,684,442) 6p23p11.2(14,710,063-57,467,174) 7pter(92,532-56,786,860) 7qter(62,654,304-159,088,636) 8qter(56,737,183-146,280,020) 12p13.31(5,916,479-9,845,660) 12p11.22p11.21(30,435,583-32,397,335) 12q12q21.2(57,485,677-76,083,707) 14qter(20,582,059-107,258,824) 16pter(106,271-34,272,321) 16qter(46,726,341-90,111,263) 17qter(25,590,352-81,029,941)
LC27	nainen	13q12.2q34(28,379,980-115,059,020) 19pter(327,273-23,513,458) 19q13.32q13.43(46,268,084-58,116,694)	1q21.2qter(149,857,165-249,212,668) 10p15.1p11.1(4,666,957-38,193,176) 10q11.23q21.1(52,006,170-56,196,446) 14q11.2q24.2(20,582,059-72,238,092)
LC46	mies		1q21.2q24.3(150,257,376-171,754,884) 14q11.2q21.1(23,237,589-39,857,632)
LC52	nainen	3p26.1p25.3(7,327,122-8,749,407) 3p25.1(13,421,481-14,021,656) 3p24.2p22.3(25,700,343-32,544,483) 3p21.31(45,959,700-50,273,210) 3p14.1(64,081,363-69,088,115)	1p36.22p34.3(10,115,173-36,106,454) 1qter(144,988,715-249,212,668) 2q11.2q34(97,260,682-214,354,752) 3p13p12.3(70,868,754-74,413,474) 3q11.2q13.11(98,168,542-105,404,293)

		3p12.3(76,026,268-79,132,976) 3q26.33qter(179,052,601-197,840,339) 4pter(388,344-48,895,580) 5q12.3q33.3(64,313,998-156,304,857) 6qter(62,390,475-170,890,108) 15q11.2q26.3(22,925,956-102,465,355) 16p13.3p11.2(106,271-29,707,432) 20q13.33(61,299,441-61,704,303) 22q11.1qter(17,570,807-51,178,264) Xp22.33p11.21(2,744,701-55,479,633) Xq11.2q28(63,510,019-152,996,398)	5pter(151,737-46,100,367) 5q11.1q12.1(49,690,172-62,422,004) 6pter(170,426-56,047,442) 7p21.3(10,382,545-56,643,855) 7qter(69,773,947-159,088,636) 8qter(47,681,335-146,280,020) 11pter(770,222-49,427,777) 12qter(38,572,677-133,819,092) 13q33.2q34(105,286,434-114,169,675) 14qter(20,781,535-107,258,824) 15q26.1q26.2(93,805,530-95,889,086) 16p11.2(29,976,604-31,905,747) 18pter(4,908,480-14,102,527) 18q11.2qter(19,762,881-77,982,126) 20p13p11.1(1,108,046-26,075,841) 20q11.21q13.12(29,888,477-44,911,295) 20q13.12q13.33(45,606,928-62,893,189) 20q13.33qter(59,427,254-60,688,157) 21q21.1q22.3(18,081,105-48,067,924)
LC73	mies		5p13.3p12(33,402,313-43,944,605)
LC75	nainen	8pterp21.2(221,611-26,196,529) 13q12.2q14.2(28,875,081-50,679,218) 16q23.1qter(77,647,054-90,111,263) 17pterp12(87,009-13,557,539) 18p11.32p11.23(14,316-8,306,657)	1qter(144,927,778-249,212,668) 2pter(42,444-90,105,896) 3qter(93,653,864-197,840,339) 5pterp14.3(151,737-22,246,071) 5q33.3qter(156,780,251-180,684,501) 6q16.1q25.3(97,906,135-160,182,777) 7pterp11.2(92,532-57,262,076) 9p24.3p13.2(271,257-38,205,685) 11pterp11.2(218,365-45,553,928) 13q12.12(23,903,799-24,807,317) 14q31.3q32.2(88,651,756-98,759,778) 16p13.3p11.2(3,165,058-34,272,321) 16q22.1(67,672,633-70,442,715) 17qter(25,403,446-81,029,882) 18q12.1q12.2(29,263,677-35,865,390) 19qter(28,740,835-59,092,570) 20qter(29,959,980-62,893,189)
LC79	nainen	Xpterp22.33(61,091-2,362,192)	8q24.12q24.22(121,464,556-135,822,767) 9p24.1p23(4,768,744-9,872,132)
LC80	mies		5pter(2,948,460-45,829,655) 19q13.12 qter(36,079,312-59,092,570)
LC81	mies	19pterp13.2(327,273-12,042,486) 19q13.31q13.42(44,793,064-54,438,109)	20q13.31q13.33(55,304,739-62,065,069)

LC82	nainen	6q12q23.2(66,280,326-131,900,272) 13q21.2q32.1(61,190,142-95,518,325)	1q21.2qter(150,257,376-249,212,668) 6p24.2p21.31(11,083,745-35,105,577) 8p21.3p11.1(23,081,206-43,333,638) 8q12.1q24.3(57,897,844-143,744,955) 14q11.2-q32.33(2,058,059-107,258,824)
LC83	nainen		5pterp14.2(151,737-24,098,307)
LC84	nainen		12q14.1(58,110,202-59,764,208)
LC85	nainen	3p21.31(45,959,700-48,933,111) 6q22.1q25.3(117,590,391-159,137,328)	2p25.3p11.2(42,444-83,452,304) 5pter(151,737-45,829,655)
LC86	mies	1p33p12(49,295,155-120,585,423) 3pter(93,949-90,254,062) 6qter(62,944,549-170,890,108) 17pter(87,009-22,205,821) 19pterp13.11(327,273-17,037,020) 21qter(14,640,392-48,067,924)	17q22qter(56,162,241-81,029,941)

Potilasnäytteestä LC5 osoitettiin deleetioiden ja amplifikaatioiden lisäksi yksi amplikon.

Näyte	Sukupuoli	Amplikonit (x4)
LC5	nainen	17q12(35,641,794-37,988,426)

QC-raportit

Näyte	Hybridi-soitu	Array ID	Hajonta	Cy3 intensi-teetti	Cy5 intensi-teetti	Cy3 tausta	Cy5 tausta
LC52	10.01.2013	252192415437	0,48	561,86	243,79	12,29	4,62
LC55	10.01.2013	252192415437	0,63	483,80	516,51	18,36	15,46
LC75	10.01.2013	252192415437	0,64	454,38	130,30	11,73	5,55
LC77	10.01.2013	252192415437	0,64	344,47	100,72	12,09	4,52
LC78	10.01.2013	252192415437	0,53	831,42	1309,21	27,23	26,33
LC81	10.01.2013	252192415437	0,58	1154,16	631,46	30,64	14,34
LC85	10.01.2013	252192415437	0,46	573,91	937,84	9,75	11,19
LC1	28.01.2013	252192418785	0,73	981,57	294,31	21,77	8,64
LC7	28.01.2013	252192418785	0,72	1272,98	716,34	48,25	31,42
LC12	28.01.2013	252192418785	0,59	353,08	136,45	11,56	5,59
LC73	28.01.2013	252192418785	0,74	423,07	255,71	18,10	9,41
LC82	28.01.2013	252192418785	0,85	216,28	373,03	7,40	16,74
LC83	28.01.2013	252192418785	0,58	442,14	148,24	14,22	5,97
LC87	28.01.2013	252192418785	0,54	1088,98	811,69	37,85	27,75
LC9	30.01.2013	252192418869	0,60	427,49	60,64	10,22	3,88
LC23	30.01.2013	252192418869	0,57	658,52	260,25	21,43	13,00
LC27	30.01.2013	252192418869	0,73	460,51	36,48	9,73	3,12
LC46	30.01.2013	252192418869	0,50	547,47	266,66	21,76	10,02
LC79	30.01.2013	252192418869	0,65	436,73	128,14	12,02	6,77
LC84	30.01.2013	252192418869	0,69	332,60	115,52	12,20	5,59
LC2	13.02.2013	252192418870	0,60	1018,07	303,29	41,01	5,86
LC5	13.02.2013	252192418870	0,58	498,37	107,27	19,16	3,36
LC10	13.02.2013	252192418870	0,65	115,15	31,11	5,71	3,61
LC11	13.02.2013	252192418870	0,52	75,32	294,00	5,41	8,51
LC24	13.02.2013	252192418870	0,55	95,01	269,82	5,20	4,72
LC76	13.02.2013	252192418870	0,52	249,46	319,07	6,02	5,41
LC80	13.02.2013	252192418870	0,60	195,46	551,42	6,86	9,78
LC86	13.02.2013	252192418870	0,54	310,84	393,58	8,14	8,64